UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 1974 — THÈSE N° 680

RÔLE ANTIPOLLUANT DES SÉDIMENTS ARGILEUX

THÈSE POUR LE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ
(Mention Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement le 10 juillet 1974

PAR

Christiane COUTELLE-LABARTHE

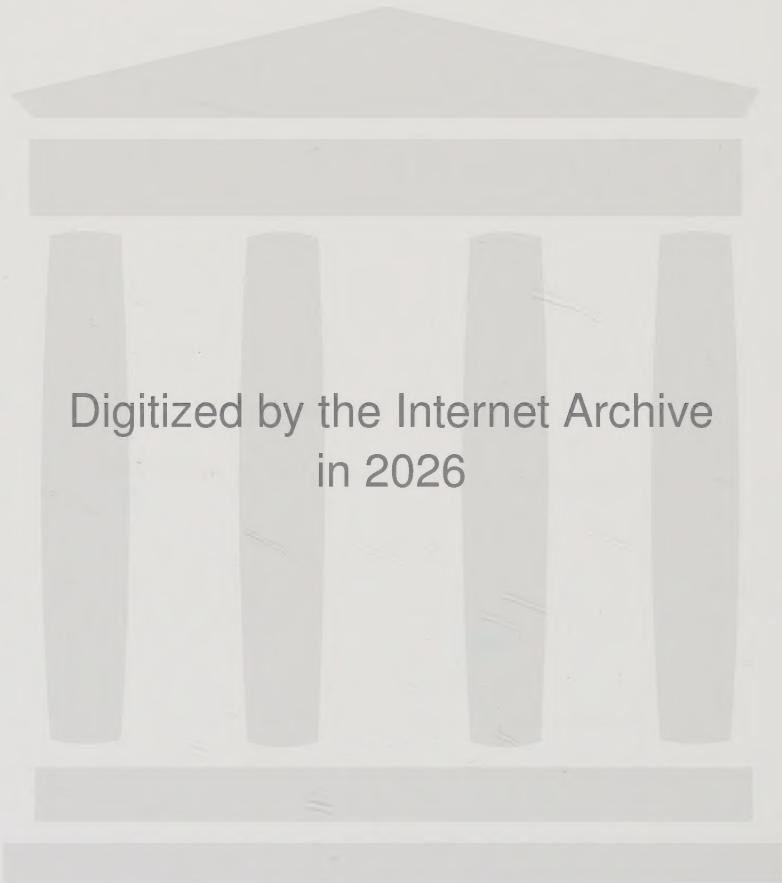
PHARMACIEN
ATTACHÉ DE FACULTÉ
ASSISTANT DE SCIENCES FONDAMENTALES

née le 7 février 1943 à Biarritz (Pyrénées-Atlantiques)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. R. JENSEN ..... *Président*
J. CANELLAS ..... *Juges*
G. DEVAUX .....
E. JOUZIER .....

— 1974 —


Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41547319_0029

UNIVERSITÉ DE BORDEAUX II

UNITÉ D'ENSEIGNEMENT ET DE RECHERCHES DES SCIENCES PHARMACEUTIQUES

ANNÉE 1974 — THÈSE N° 680

RÔLE ANTIPOLLUANT DES SÉDIMENTS ARGILEUX

THÈSE POUR LE DOCTORAT D'UNIVERSITÉ
(Mention Pharmacie)

présentée et soutenue publiquement le 10 juillet 1974

PAR

Christiane COUTELLE-LABARTHE

PHARMACIEN
ATTACHÉ DE FACULTÉ
ASSISTANT DE SCIENCES FONDAMENTALES

née le 7 février 1943 à Biarritz (Pyrénées-Atlantiques)

EXAMINATEURS DE LA THÈSE :

MM. R. JENSEN ..... *Président*
J. CANELLAS .....
G. DEVAUX ..... *Juges*
E. JOUZIER .....

— 1974 —

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

A MA GRAND-MERE

A MA MERE

A MON MARI

A MES ENFANTS

A TOUS LES MIENS

A nos juges

Monsieur le Professeur J. CANELLAS

Directeur de l'U.E.R. des Sciences Pharmaceutiques
Professeur de Pharmacodynamie et Hydrologie.
Licencié ès Sciences.
Officier des Palmes Académiques.

Nous assurons Monsieur le Doyen de toute notre reconnaissance pour le grand honneur que nous apporte sa présence dans notre jury de thèse et nous l'en remercions vivement.

Monsieur le Professeur G. DEVAUX

Professeur de Pharmacie Chimique.
Licencié ès Sciences.

Nous lui sommes sincèrement reconnaissants de s'être intéressé à notre travail et d'avoir accepté de juger notre thèse.

Monsieur le Professeur Agrégé E. JOUZIER

Maître de Conférences Agrégé de Chimie Biologique.

Nous tenons à lui exprimer nos plus profonds remerciements pour avoir bien voulu siéger parmi nos juges.

A notre Président de thèse

Monsieur le Professeur R. JENSEN

Professeur de Chimie Biologique.
Biologiste des Hôpitaux, Chef de service.
Docteur en Pharmacie (Etat).
Docteur ès Sciences (Etat).
Chevalier des Palmes Académiques.

Vous nous avez fait l'honneur de nous diriger dans ce travail et d'en accepter la présidence.

Vous en avez suivi et conseiller l'élaboration, en plus de la diversité de vos tâches Hospitalo-Universitaires.

Vous nous avez beaucoup aidé pour que nous puissions le mener à bien.

Veuillez trouver ici l'expression de notre profonde reconnaissance et de notre respectueuse gratitude.

AVANT - PROPOS

"Dieu modula l'homme avec la glaise du sol..."
(Genèse, chapitre 2 verset 7).

Nous avons toujours été intrigués par le rôle très important que joue l'argile dans la vie de l'homme et cela quelque soit l'époque. En effet depuis la très haute antiquité, les grands rassemblements humains se sont concentrés sur des terrains argileux qui leur apportaient le gîte par les briques, cuites ou non cuites, la nourriture par leur fertilité et leur humidité propre, et enfin la santé par certaines de leurs propriétés : antirhumatismales en particulier.

C'est ainsi que le *"croissant fertile"* berceau de notre humanité, dont il ne reste qu'une couverture de sable infertile, était caractérisé par une richesse agricole qui dépendait des innondations périodiques des grands fleuves orientaux : le Tigre et l'Euphrate, le Nil ; la fertilité des limons propre à cette région a frappée bien des écrivains et nous savons que les engrais les plus actifs sont en partie constitués d'amino acides. Par ailleurs ces mêmes amino acides induisaient un retour à la poussière des briques, qui ne pouvait être enrayé que par une cuisson prolongée détruisant ces matières organiques.

Enfin un des livres de la Bible, la Génèse, place la création de l'homme dans le *Croissant fertile*, à partir de la boue. Cela ne serait-il pas révélateur des expériences de KATCHALSKY (27) conduisant à la synthèse des protéines par l'intermédiaire d'un support argileux ? Curieuse coïncidence, avec les travaux d'OPARIN et Coll (40) et plus troublant sont en effet les mots que nous utilisons chaque jour ayant oublié leur étymologie : ainsi, si nous ne nous étonnons pas trop de voir que le nom du premier homme ADAM veut dire sol, nous sommes surpris d'apprendre que "EGYPTE" était associée au hiéroglyphe KEMI qui veut dire boue noire (31).

Lorsque nous sommes rentrés au laboratoire de Biochimie Analytique de Monsieur le Professeur JENSEN, dont l'activité principale résidait dans le dosage des amino acides, Monsieur le Professeur JENSEN nous a proposé d'étudier la composition en amino acides des vases du bassin d'ARCACHON, c'est-à-dire de sédiments silico-argileux marins.

Il avait observé comme beaucoup d'entre nous que l'odeur nauséabonde qui se dégageait à marée basse et par temps chaud en de nombreux endroits du bassin d'ARCACHON, était l'indice d'une fermentation intense ou d'une putréfaction, celle-ci pouvant être en relation directe avec un support biochimique composé d'amino acides. De plus, nous pouvions constater que la pollution des eaux du bassin étant faible, la fermentation des vases n'engendrait pas une pollution supplémentaire : aucune épidémie ne s'étant déclarée parmi les milliers d'estivants qui envahissent les rives du bassin en été.
D'autre part, les quelques récits historiques que nous connaissons nous montrent que chaque fois qu'il y a eu une inondation (annuelle ou accidentelle) les terres recouvertes retrouvaient après le retrait des eaux un regain de fertilité. Monsieur le Professeur Agrégé JENSEN nous suggéra d'étudier la coloration entre ces différents phénomènes.

Notre plan d'étude sera le suivant :
Dans une première partie nous rassemblerons les données géologiques concernant les argiles ainsi que quelques notions sur la géographie du bassin d'ARCACHON, dans une deuxième partie nous détaillerons d'une part les différentes techniques d'analyses utilisées et les résultats obtenus pour

deux échantillons de sédiment prélevés dans le bassin d'ARCACHON, d'autre part nous étudierons les modalités de fixation des amino acides sur une argile particulière ; une argile possédant la propriété de fixer la matière organique azotée nous envisagerons enfin l'application de cette propriété à l'épuration d'eaux vannes.

Nous ne saurions terminer cet avant propos sans remercier tous ceux qui par leur compétence et leurs connaissances nous ont permis de terminer ce travail.

Nous remercions tout particulièrement Monsieur le Professeur JENSEN grâce auquel nous avons pu mener à bien cette thèse. Depuis notre entrée au laboratoire il y a maintenant plus de cinq ans, avec beaucoup de patience et de bienveillance, il a su nous intéresser à la recherche et nous guider dans l'apprentissage des techniques analytiques modernes. Dans les difficultés il nous a soutenus et encouragés et a toujours fait preuve d'une grande compréhension, nous tenons à lui faire part de notre profonde et respectueuse gratitude.

Nos remerciements s'adressent à Monsieur le Doyen CANELLAS qui nous a fait le grand honneur de siéger dans notre jury de thèse.

Nous tenons à remercier Monsieur le Professeur VRIGNAUD qui a bien voulu s'interesser à notre travail.

Nous remercions également tous nos Maîtres de Biochimie Monsieur le Doyen TAYEAU, Madame le Professeur SECHET, Messieurs les Professeurs NEUZIL, MARQUEVIELLE et JOUZIER, qui à des titres divers nous ont aidé dans ce travail.

Nous ne saurions oublier toute l'équipe du laboratoire de Biochimie Analytique qui a participé à l'élaboration de ce travail, en particulier nous remercions Mesdemoiselles GAUTHIER, FLORENTIN, DUBUCQ et QUATTROCCHI. Nous tenons à faire une mention particulière pour Mademoiselle BUFFANGEIX qui nous a toujours soutenus et aidés de sa fidèle amitié.

I N T R O D U C T I O N

La richesse de l'Egypte était due au recouvrement des terres par le Nil qui apportait en période de crues son limon noir fertilisant. Au delà des terres périodiquement recouvertes c'était le désert de sable aride et infertile. Il n'est pas étonnant que ce soit sous le terme de KEMI "terre noire" que les anciens dénommèrent l'Egypte antique.

Les récentes observations, faites par un auteur anglais TAYLOR (55) sur les conséquences du barrage NASSER à ASSOUAN, font état d'une diminution très sensible de la fertilité des rives du Nil, ceci s'expliquant par la retenue des limons au niveau du barrage. Le pays est obligé d'y pallier par l'implantation d'usines d'engrais chimiques. Une seconde conséquence, imprévisible, est la diminution de l'abondance des sardines en Méditerranée, entrainant l'effondrement des industries sardinières. En effet la Méditerranée est très pauvre en substances nutritives sauf à l'embouchure du Nil, où se déversait le limon, la coïncidence est troublante ; de plus la fertilité des rives du Nil a retenu particulièrement notre attention car le "sable" n'est fertile que dans la mesure où il contient de l'azote.

Que ce soit pour fertiliser la terre ou pour approvisionner les sardines en substances nutritives, nous nous apercevons que le limon était indispensable, ce même limon qui donnait à la terre égyptienne sa couleur noire d'où lui venait le nom de KEMI ; en fait "KEMI" qui se lit sur les monuments hiéroglyphiques (31) (on trouve aussi KEM et CHAM) a donné naissance à "CHUMOS" qui veut dire suc qui lui même a engendré le mot CHYMIE ou CHIMIE sous l'impulsion de la langue grecque :

"L'Egypte est supposée être la patrie des arts chimiques" (31).

Il était donc tout naturel que la chimie des limons, au sens propre du terme, retienne notre attention. Mais étant donné l'éloignement de l'Egypte rendant difficile une étude des limons du Nil nous avons recherché un phénomène similaire à notre portée.

Nous avons remarqué l'odeur de fermentation dégagée par le bassin d'ARCACHON à marée basse ainsi que la couleur noirâtre que prend le sable à certains endroits. Nous avons pensé qu'il y avait une analogie entre ces deux phénomènes, c'est pourquoi nous nous sommes penchés sur l'étude des sédiments du bassin d'ARCACHON communément appelés "vases". Ces "vases" présentent en surface un aspect colloïdal, qui semble être le résultat de la décomposition de restes organiques, végétaux et animaux. Elles sont associées à des argiles et du sable dont la proportion augmente avec la profondeur : l'ensemble étant intimement lié.

De par leur analogie avec les limons, ces "vases" sont riches en matière organique ; cette matière organique provient d'une part de l'environnement : débris végétaux du littoral transportés par le vent et d'autre part des cours d'eaux qui se jettent dans le bassin et qui pour la plupart constituent de véritables égouts.

Nous savons que les eaux d'égouts sont riches en matières organiques, notamment en matières organiques azotées et les eaux de rejet des stations d'épuration contiennent encore en proportion conséquente des amino acides et polypeptides. Les micro-organismes pour les

métaboliser font appel à l'oxygène de l'eau, augmentant de ce fait la Demande Biochimique en Oxygène (D.B.O.) critère de pollution. Or dans les eaux du bassin la pollution n'est pas évidente et nous nous sommes demandés si les sédiments silico-argileux n'avaient pas un rôle épurateur à ce niveau.

Dans un premier temps nous nous sommes penchés sur la composition en amino acides des sédiments récents du bassin d'ARCACHON, nous avons tenté de leur donner une signification.

Puis nous avons étudié les critères physico-chimiques de la fixation des amino acides sur un sédiment naturel pauvre en matière organique et montré qu'il était possible de fixer sur une argile une forte proportion d'amino acides en solution.

Enfin, nous avons cherché à appliquer ces propriétés à la dépollution des matières azotées d'eaux vannes et travaillé sur des eaux polluées de notre région.

P R E M I E R E P A R T I E

DIFFERENTS SEDIMENTS QUI ONT FAIT L'OBJET DE NOTRE ETUDE

Avant de détailler les différents travaux que nous avons réalisés, nous avons estimé qu'il était nécessaire de donner quelques indications sur la structure des sédiments silico-argileux plus communément appelés "argiles" et de les replacer dans leur contexte géographique. Ce développement se divisera en deux chapitres:

- Premier chapitre : Etude physico-chimique des sédiments silico-argileux.

- Deuxième chapitre: Le site naturel des sédiments étudiés : Le BASSIN D'ARCACHON.

C H A P I T R E I

ETUDE PHYSICO-CHIMIQUE DES SEDIMENTS SILICO-ARGILEUX

Les argiles sont connues depuis les temps les plus reculés et si elles permettent à l'homme de vivre, de se nourrir et d'être abrité, elles ont été aussi le berceau naturel où ont été crées les premiers acides aminés et par voie de conséquence les acides nucléiques (45).
Ces argiles, qui conditionnent si étroitement la vie de l'homme sur la terre, se trouvent réparties à peu près partout, seuls les déserts se caractérisent par l'absence presque complète de ces sédiments argileux.

En dehors de ses caractères organoleptiques, l'argile, d'après la définition du grand Larousse Encyclopédique :

"est une terre molle et grasse qui, imbibée d'eau, constitue une pâte plastique dont font usage notamment les sculpteurs" (30).

Notre travail nous a amené à étudier différentes argiles, tant celles du bassin d'ARCACHON que celles utilisées plus tard dans nos recherches ; c'est pourquoi nous avons tenu à faire un rappel géologique sommaire sur les minéraux argileux.

Les argiles sont principalement des aluminosilicates de sodium ou de magnésium. Nous décrirons ici les groupes d'argiles intéressant directement nos travaux.

I - STRUCTURE

1°) - Groupe de la montmorillonite :

La montmorillonite est un alumino-silicate hydraté dont nous donnons ci-après une formule brute (37).

$$(OH)_2 \ (Al_{1,67} \ Mg_{0,33}) \cdot Si_4 \ O_{10}, \ 4H_2O$$
$$Na_{0,33}$$

Elle tire son nom de MONTMORILLON dans la Vienne, localité où elle fut extraite pour la première fois ; c'est l'argile type°. C'est un minéral voisin des micas et caractérisé par la permutation chimique des ions échangeables. Comme nous pouvons le constater sur la formule développée, figure n° 1, il s'agit en fait d'un mica additionné d'une couche d'eau.

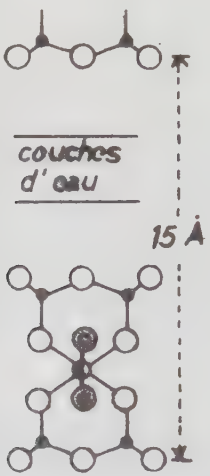


Figure n° 1 : Montmorillonite (hydratée).

○ Oxygène ◎ (OH) • Si-Al ◐ Al-Mg

° *Ce minéral a particulièrement retenu notre attention car les travaux de KATCHALSKY (27) sur la formation des protéines primitives à partir d'amino acides adénylés, catalysée par de la montmorillonite, ont donné d'excellents résultats (la montmorillonite est capable de fixer une quantité importante d'acides aminés adénylés).*

2°) - Groupe de la Kaolinite :

a - La kaolinite :

La kaolinite est un silicate d'aluminium de formule brute :

$$(OH)_4\ Al_2\ Si_2\ O_5$$

et dont la formule développée établie par GRUNER (14) a été révisée par BRINDLEY et ROBINSON (8).

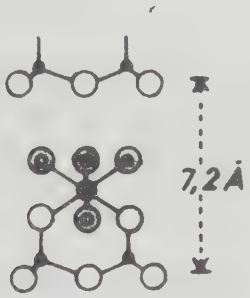


Figure n° 2 : Kaolinite.

○ Oxygène ◎(OH) ○ Silicium ● Aluminium

Kaolin vient du nom d'une colline chinoise où ce produit fut extrait au cours des siècles. Les dépôts kaoliniques se forment par accumulation dans les bassins de sédimentation, au cours du phénomène d'altération des roches. Nous noterons que les grands gisements de kaolinite prennent naissance dans les roches acides et de ce fait la kaolinite en suspension dans l'eau distillée donne un pH de l'ordre de 4,5. Il en existe de nombreux gisements en France, les plus connus étant ceux de la région limousine. La kaolinite, de par sa formation, est le minéral argileux le plus résistant car c'est un phyllosilicate (silicate en feuillets) électriquement neutre.

b) - Halloysite :

L'halloysite est un silicate d'aluminium hydraté de formule brute :

$$(OH)_4\ Al_2,\ Si_2,\ O_5,\ H_2O$$

Elle correspond à des feuillets de kaolinite séparés par des couches d'eau. Des substitutions peuvent se produire sur les atomes d'aluminium. Par chauffage l'halloysite redonne de la kaolinite par départ des molécules d'eau, elle est alors appelée méta-halloysite.

3°) - *Groupe des micas* :

Les micas nous ont paru digne d'intérêt de par leur abondance dans les sédiments récents du bassin d'ARCACHON ; ce sont eux qui leur confèrent un aspect pailleté, en particulier la muscovite (mica blanc) dont la formule brute est la suivante :

$$(OH)_2\ Al_2,\ Si_3,\ Al\ O_{10}$$
$$K$$

Il existe un déficit de charge de l'aluminium comblé par le potassium (ou par le sodium pour la paragonite, autre variété de mica). Leur structure a été établie par MAUGUIN (34) et PAULING (42).

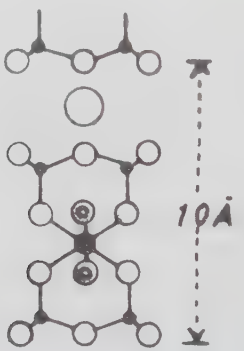


Figure n° 3 : Mica (muscovite).

○Oxygène ◎(OH) •Si-Al ●Aluminium ○Potassium

4°) - Groupe des chlorites :

Nous mentionnons ce groupe pour mémoire, car les chlorites sont très abondantes dans la nature. Ce sont des minéraux phylliteux caractérisés par des ions interfolliaires fixés et non échangeables. Elles sont riches en fer ferreux qui leur donne une coloration verte. Certaines difficultés apparues dans l'analyse des amino acides contenus dans différentes argiles ont été directement imputables à la présence de Fe^{++}.

II - STABILITE DES ARGILES EN FONCTION DU MILIEU

Ces argiles sont des minéraux présentant une certaine homogénéité de par leur charpente silicatée. D'après MILLOT (37) cette charpente est d'autant plus stable que le nombre des sommets des polyèdres la constituant est faible et par conséquence que le cation central est petit et sa valence élevée.

Les argiles les plus stables seront celles constituées d'un plus grand nombre de tétraèdres et les moins stables seront celles qui auront en abondance des ions de fort diamètre, de faible charge et donc de faible potentiel ionique, ces ions étant engagés dans des polyèdres très volumineux, dont de ce fait les liaisons seront plus fragiles.

L'attaque de cette charpente dépend du milieux : en milieu acide il y a plus d'aluminium libéré que de silice, alors qu'en milieu neutre il y a plus de silice libérée que d'aluminium : en milieu alcalin, silice et aluminium seront libérés en partie égale ; ceci s'explique par le fait que les liaisons Si-O-Al sont plus fragiles que les liaisons Si-O-Si. En présence d'acides organiques, cette attaque se traduit par une augmentation de l'hydrolyse de ces argiles qui les a fait considérer comme des sels d'acides faibles et de bases fortes.
Ce bref rappel de certaines particularités des argiles nous permet de comprendre leur aptitude à s'associer à la matière organique.

III - ASSOCIATION ARGILE - MATIERE ORGANIQUE

Depuis des siècles, l'argile commune, après une cuisson plus ou moins prolongée constitue, la brique de nos habitations : la chaleur a pour but entre autre de détruire la matière organique qui lui est associée, conférant ainsi une plus grande solidité à ce matériau de construction classique.

Certaines propriétés des argiles font appel à ces associations, c'est ainsi que la terre à Foulon, qui n'est autre qu'une argile smectique° connue pour son aptitude à fixer la matière organique, est utilisée depuis longtemps pour dégraisser la laine.

Certaines substances humiques sont capables de s'associer aux argiles de façon plus ou moins stables selon leur nature.

De plus les argiles peuvent être employées dans l'épuration de certaines eaux car elles sont à même de capter en quantité appréciable les matières polluantes de type organique.

Les processus de fixation ont fait l'objet de différentes hypothèses. D'une part il peut y avoir l'entrée en jeu de la trame même de l'argile qui possède dans certains cas (montmorillonite par exemple) la faculté de se dilater permettant la fixation de substances organiques type amino acides dans l'espace interfolliaire (TALIBUDEEN (54)).

L'étude par HAXAIRE (19) de l'adsorption par la montmorillonite de quelques acides aminés montre qu'il existe dans le cas du glycocolle deux mécanismes concomitants : échange d'ions et fixation moléculaire.

Il faut préciser que quelque soit le mode de fixation, différents paramètres entrent en jeu comme le pH, la concentration ; SIESKING (48) a étudié le rôle de ces deux paramètres sur l'adsorption de quelques amines aliphatiques, acides aminés aliphatiques et acides gras sur la montmorillonite ainsi que l'influence des groupements NH_2 et COOH.

Nous constatons que les modes d'association argile-matière organique, malgré leur importance dans la nature restent encore mal définis.

° ° °

° *Smectique de racine smegma : "savon".*

C H A P I T R E II

LE SITE NATUREL DES SEDIMENTS ETUDIES :

LE BASSIN D'ARCACHON

Si les sédiments argileux ont, surtout à l'état humide, une odeur caractéristique de "terre mouillée", l'odeur des vases du bassin d'ARCACHON à marée basse et en période estivale est particulière et significative d'une fermentation très intense.

Nous avons étudié la composition en amino acides de ces vases mais avant de décrire les résultats que nous avons obtenus, il nous a semblé nécessaire de préciser d'un point de vue géologique et géographique la configuration de ce golfe si particulier.

1°) - Aspect géologique du bassin d'ARCACHON :

Il semble actuellement bien établi que le bassin d'ARCACHON, très fréquenté par les bordelais, a toujours été en communication avec la mer et n'a jamais été formé aux dépens d'une lagune d'eau douce dont les dunes protectrices du côté de la mer se seraient désagrégées au cours d'un cataclysme.

D'une manière schématique, le fleuve côtier la Leyre, aurait eu son embouchure à peu près à son emplacement actuel, dans une direction Nord-Ouest, de ce fait, la rive océane était grossièrement dessinée par le fond actuel du bassin d'ARCACHON se limitant à une ligne, LEGE - AUDENGE (figure n°4).

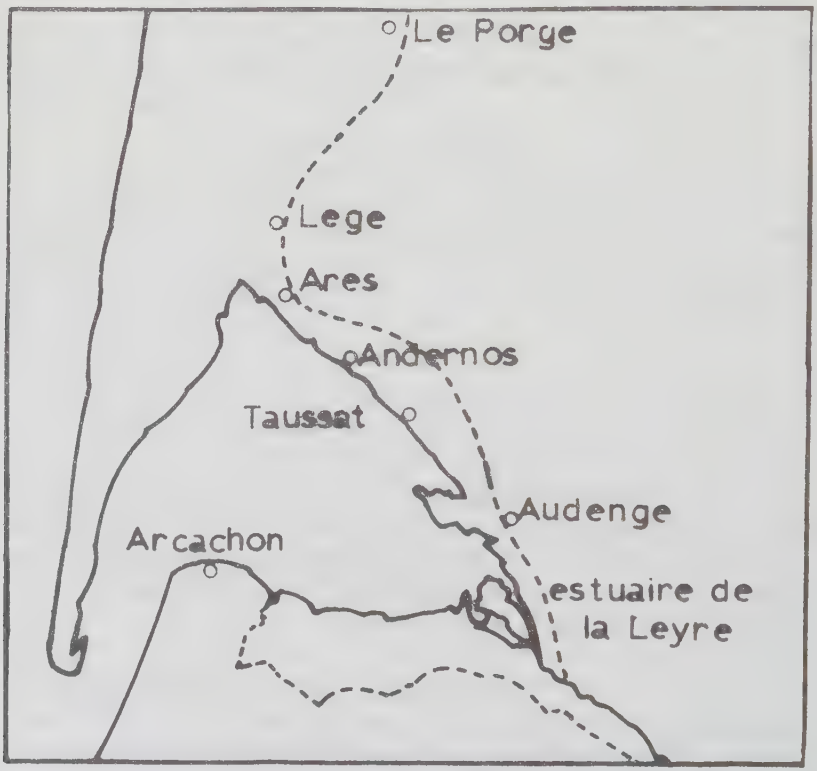


Figure n° 4 : Carte de l'estuaire de la Leyre (13).
------ anciennes limites de l'estuaire.

Nous ne saurions mieux décrire cette configuration qu'en citant ici les travaux de FABRE (13) :

"Tout ce qui se trouve à l'Ouest de cette ligne (LEGE - AUDENGE) a été édifié au quaternaire par des apports continentaux et marins. Il résulte de ce fait que la rive orientale du bassin d'ARCACHON constitue le véritable littoral du continent".

Le bassin d'ARCACHON était donc à l'origine l'estuaire de la Leyre ouvert en direction du Nord vers LEGE et en direction de l'Ouest vers ARCACHON formant un vaste "entonnoir" délimité par les localités de LEGE, d'AUDENGE et d'ARCACHON (Figure n° 4).

Au cours du quaternaire une langue de sable semble s'être édifiée tout au long de la côte landaise, emprisonnant des masses d'eau de mer qui ont donné naissance aux nombreux étangs qui bordent cette côte de l'embouchure de la Gironde à celle de l'Adour.
D'autre part cette barre de sable a, en partie seulement, fermé l'estuaire de la Leyre délimitant l'actuel bassin d'ARCACHON. La langue de sable dunaire du CAP FERRET, a varié au cours des siècles et un relevé topographique de 1831 montre qu'elle était beaucoup plus avancée qu'à l'heure actuelle, bien qu'en étant loin de fermer complètement le bassin.

D'après les spécialistes (13) et dans l'état actuel des choses, le bassin d'ARCACHON ne pourra pas devenir un étang totalement indépendant des marées, c'est-à-dire fermé sur la mer, en raison de la vitesse et de l'orientation des très forts courants côtiers qui s'y forment constamment, entretenant un chenal important. ("Les passes" du bassin sont réputées dangereuses à cause de ces courants).

De plus les différents fleuves côtiers charient des alluvions qui tendent à combler peu à peu certaines parties du bassin et à faire avancer la rive Est vers l'Ouest, mais ce phénomène, relativement peu important, est contrebalancé par un mouvement d'affaissement du sol, ceci concourant à assurer aux rives du bassin d'ARCACHON une stabilité relative :

"néanmoins le comblement des parties occidentales et méridionales tend à produire leur émersion à une échéance plus ou moins lointaine". (FABRE (13)).

Les différents bancs de sable dont les variations peuvent être constatées, même par des néophytes, d'une année sur l'autre, ont été formés par l'alluvionnement actif de la Leyre et les différents courants ; l'Ile aux Oiseaux en est le modèle type, elle est bien connue des familiers du bassin qui savent à quels problèmes ils ont à faire face pour y aborder (courant, vases).

Le substrat géologique sur lequel s'est formé le bassin d'ARCACHON est d'âge tertiaire et est constitué de terrains essentiellement argilo-calcaires.
D'une manière générale, nous pouvons considérer que le dépôt des particules fines, poudres et précolloïdes (c'est-à-dire les vases), augmente vers l'Est du bassin.
Nous avons représenté sur la figure n° 5 la nature des sédiments.

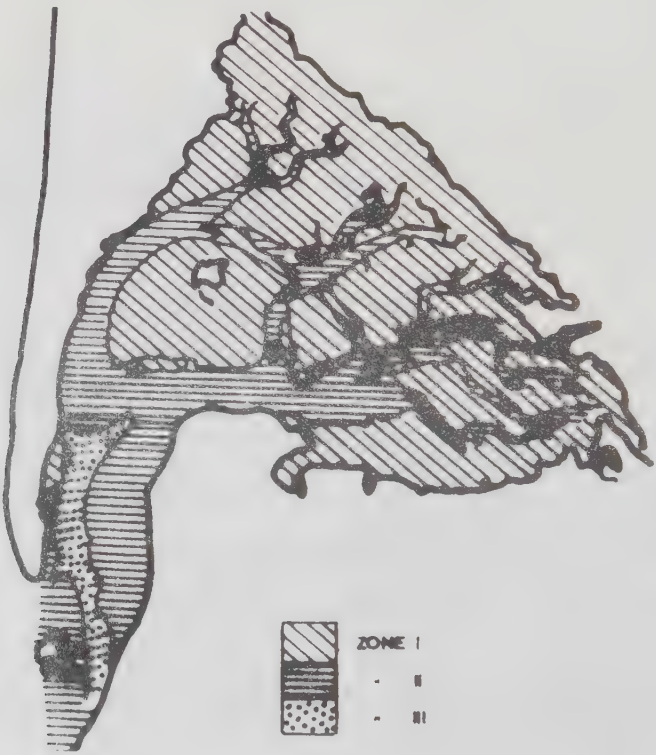


Figure n° 5 : BASSIN D'ARCACHON.
Répartition des sédiments.

Les principales zones de répartition sont les suivantes :

Zone I : - sables vaseux et vases sableuses.
Zone II : - sables fins terrigènes.
- sables fins dunaires.
- sables moyens dunaires.
Zone III : - sables grossiers et fins graviers coquilliers.
- fonds graviers et cailloux.
- fonds coquilliers.

Les sédiments d'origine marine ont été recouverts par des graviers et des sables fluviatiles et éoliens qui ont donné des bancs plus ou moins stables. Ce qui explique que la sédimentation actuelle n'est pas répartie d'égale manière sur tout le bassin, elle varie selon la profondeur et la turbulence des eaux ; ainsi les "crassats exondés" sont formés de vases alors que le fond des chenaux est en général sableux et plus ou moins riche en coquilles. La sédimentation fine est seulement réalisable dans les endroits calmes à l'abri des courants. (BOUCHET (7)).

L'aspect macroscopique des dépôts permet de dire que ce sont des vases sableuses ou des sables vaseux (selon les proportions relatives de chacun des constituants), très riches en paillettes de micas décelables par leur éclat. Au niveau des crassats le sédiment couramment appelé "vase" que l'on découvre plus particulièrement à marée basse, est étonnant tant par sa couleur et son odeur que par sa consistance physique désagréable. Il est enrichi par une flore aquatique importante (varech ou herbier), par des coquillages et vers de toutes sortes, et une microfaune ou méïobenthos. Son épaisseur est variable et dépend des courants et des phénomènes météorologiques, (les fortes marées et les violentes tempêtes obligent souvent les ostréiculteurs à déblayer les parcs à huitres). Son épaisseur moyenne est de l'ordre de 70 à 80 centimètres. Sur cette épaisseur la couche oxydée ne dépasse pas un ou deux millimètres ce qui laisse penser que les échanges gazeux sont faibles dans les sables vaseux et les argiles sableuses,

La plupart du temps le milieu sédimentaire anaérobie réducteur permet la formation d'hydrogène sulfuré à l'odeur caractéristique.

b) - Aspect géographique :

Le bassin d'ARCACHON est une vaste étendue d'eau de mer d'une superficie voisine de 4 900 hectares, communicant avec la mer par un chenal relativement étroit parallèle à la côte. Ce bassin d'une configuration presque triangulaire peut être schématisé comme suit :

- un côté, pratiquement de direction Nord-Sud, depuis ARES au Nord jusqu'à la pointe du CAP FERRET au Sud, est constitué par un cordon littoral sableux d'une largeur variant de 1 500 mètres environ au Nord à quelques mètres à son extrémité Sud.
- Un autre côté sensiblement Nord-Est d'ARES à AUDENGE représente l'ancienne rive océane du continent.
- Le dernier côté est presque perpendiculaire au cordon littoral sur une ligne Est-Ouest d'AUDENGE à ARCACHON. Il est soumis deux fois par jour à l'action des marées, cela représente le brassage de 370 millions de mètres cube pour une marée moyenne. Ce volume d'eau considérable est le siège de très violents courants dont l'intensité et les caprices induisent des changements constants dans les "bancs" sableux ou vaseux, changement rendant le plus souvent caduques les cartes des fonds du bassin et provoquant quelquefois l'échouage des bateaux ou embarcations même dirigés par des spécialistes du bassin.

L'action du flux et du reflux combinés à l'écoulement des eaux douces en provenance des différents fleuves côtiers : la Leyre au Sud-Est (qui donne l'Eyre et le Leyga), le courant de LEGE au Nord, le canal de CAZAUX au Sud ainsi qu'une douzaine de petits ruisseaux qui drainent la forêt landaise et se jettent principalement sur la côte Est, et des égoûts, ont eu pour conséquence le creusement au cours des siècles des différents chenaux et l'édification de crassats exondés.

En effet le bassin tel que nous le connaissons a évolué au cours des siècles. Si nous nous référons à la première carte officielle du bassin dressée en 1708 (carte de Masse) nous constatons que c'est surtout au

niveau de la configuration des bancs de sable (CAP FERRET inclus) et des chenaux que les changements sont le plus frappants. Nous citerons pour exemple d'une part l'érosion des bancs comme l'Ile aux Oiseaux qui a été fortement creusée au Sud, et qui a été détachée du banc de Malpouchet, au contraire nous remarquons l'avancée de la flèche sableuse du CAP FERRET jusqu'au niveau du PILAT°-PLAGE (1831) (figure n° 6) pour ensuite regresser et présenter sa topographie actuelle ce qui correspond à un recul vers l'Ouest de 1 500 mètres environ et une remontée vers le Nord de 1 000 mètres (BOUCHET).

Figure n° 6 : Le CAP FERRET et les "passes" du moyen âge au 18ème .....
en 1831 ------
de nos jours ———

D'autre part, les chenaux se sont érodés ou comblés comme c'est le cas pour le chenal du CAP FERRET qui a rétréci et s'est considérablement creusé, tandis que le chenal d'ARES s'est comblé et a perdu le rôle prépondérant qu'il occupait autrefois.

Mais bien qu'étant le siège de remaniements incessants, le bassin d'ARCACHON n'en constitue pas moins un des plus grands et des plus fréquentés bassin d'eau de mer de FRANCE, de part sa position privilégiée et son sîte particulièrement abrité. Il a depuis la fin du siècle dernier pris un essor considérable comme lieu de villégiature hivernale et surtout estivale et c'est par milliers chaque été que les vacanciers viennent sur ses bords.

° *PILAT veut dire mont et PYLA le passage.*

Les supports naturels que constituent les crassats ont servi à l'implantation de l'ostréiculture. Déjà RABELAIS connaissait les huîtres du bassin mais l'organisation industrielle des parcs date de la moitié du 19ème siècle (1856). Avec 13 500 tonnes en 1969° et l'implantation récente de souches d'huîtres japonnaises, ARCACHON figure parmi les plus grands centres producteurs d'EUROPE.

Les environs du bassin sont essentiellement plantés de pins (*pinus pinaster*) dû à l'initiative de BREMONTIER (1788) dans le but de retenir le sable des dunes. Les végétaux sous l'action du vent sont transportés jusqu'au bassin dans les eaux duquel ils viennent se déposer et se décomposer par rouissage, et les feuilles et débris de toutes sortes répandus par les cours d'eaux avoisinants forment un tapis inerte où règne une intense activité microbienne.
A cet apport que nous pourrions qualifier de naturel vient s'ajouter une quantité importante de matières organiques déversées par les égoûts de la Leyre et les différents cours d'eaux, essentiellement pollués par les eaux usées domestiques. Dans la mesure où nous considérons qu'une partie de la matière organique présente les sédiments silico-argileux du bassin d'ARCACHON provient des eaux d'égoûts, notre étude se devait donc d'être intimement liée au phénomène de la pollution des eaux. En effet les cours d'eaux se jettant dans le bassin d'ARCACHON ont un fort degré de pollution qui constitue une menace pour son écologie et son économie et l'opinion publique sensibilisée par les dangers de la pollution des eaux a pris conscience de cette menace. La pollution des eaux du bassin n'est pas en rapport avec les énormes volumes d'eaux très polluées qui s'y déversent chaque année et que l'autoépuration et le brassage des marées ne suffit pas à expliquer totalement. C'est pourquoi nous nous sommes penchés sur l'étude de la matière organique présente dans les sédiments récents du bassin d'ARCACHON et plus particulièrement sur la composition en amino acides de ce sédiment.

° *Chiffre communiqué par l'Observatoire Economique du Sud-Ouest.*

D E U X I E M E , P A R T I E

TRAVAUX PERSONNELS

Dans cette seconde partie nous exposerons dans un premier chapitre les méthodes analytiques utilisées pour le dosage des amino acides présents dans les sédiments récents du bassin d'ARCACHON, et dans l'eau de mer qui se trouve en contact direct avec ces sédiments. Pour ce dosage nous avons fait appel d'une part à la méthode de SATAKE (47) ; cette méthode qui s'applique en fait au dosage d'un amino acide à la fois, nous a donné lors d'essais préliminaires de très bons résultats pour le dosage des amino acides totaux de différents hydrolysats, c'est pourquoi nous l'avons employée pour une évaluation globale des amino acides contenus dans nos échantillons. D'autre part en vue d'un dosage qualitatif et quantitatif, nous avons appliqué la méthode chromatographique liquide-liquide de HAMILTON (15).

Dans un deuxième chapitre nous rassemblerons tous les résultats relatifs au dosage des amino acides par les différentes méthodes. Nous les détaillerons et nous essayerons d'en tirer un certain nombre de conclusions.

Dans un troisième chapitre nous étudierons la capacité de fixation des amino acides sur un sédiment naturel ainsi que les facteurs pouvant influencer cette fixation : concentration, pH, temps de contact, nature de l'amino acide.

Enfin dans un quatrième chapitre nous envisagerons l'application de cette fixation des amino acides sur un sédiment à la pollution azotée de certaines eaux, ainsi que l'emploi de l'argile récupérée après contact avec ces eaux polluées.

C H A P I T R E I

ANALYSE DES AMINO ACIDES CONSTITUTIFS DES SEDIMENTS RECENTS DU BASSIN D'ARCACHON

METHODES ANALYTIQUES

La composition minérale des sédiments récents du bassin d'ARCACHON a été maintes fois étudiée, mais leur composition organique n'a fait l'objet à notre connaissance que de peu de recherches (CONNAN (11)). Ceci est d'autant plus étonnant que c'est semble-t-il aux dépends de ces sédiments que se nourissent des milliers de coquillages, vers et autres animaux.

Outre l'étude des éléments analytiques suivants : pH et ions sulfure, nous nous sommes particulièrement penchés sur l'étude des amino acides contenus dans ces sédiments silico-argileux ainsi que dans l'eau de mer avec laquelle ils sont en contact permanent.

INTRODUCTION

- *Lieu et technique de prélèvement des échantillons :*

Les carottes de sédiment que nous avons analysées, ont été prélevées dans le bassin d'ARCACHON à la hauteur de CLAOUEY, près du chenal de LEGE (figure n° 7). Ce sédiment se trouve à la limite d'étendues confinées, c'est-à-dire des zones que les eaux ne recouvrent pas habituellement deux fois par jour, endroit qui nous a paru particulièrement représentatif pour la suite de notre étude.

Figure n° 7 : Lieu de prélèvement :
1) CLAOUEY, 2) chenal de LEGE,
3) point de prélèvement.

Le prélèvement des carottes° a été réalisé au moyen d'un carottier à piston mobile, en matière plastique d'une longueur de 50 centimètres et d'un diamètre de 4 centimètres environ.

Le carottier est composé d'un cylindre en matière plastique dans lequel peut coulisser un piston métallique surmonté d'une tige.

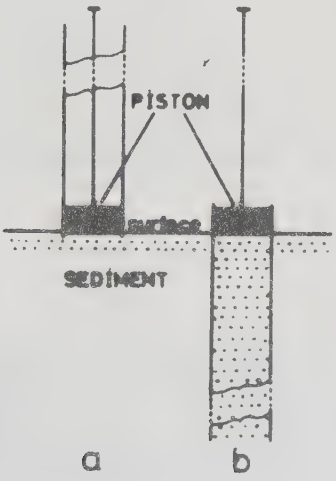


Figure n° 8 : a) le carottier est appliqué à la surface du sédiment.
b) Le carottier a atteint la profondeur maximale.

Le mode opératoire est le suivant : le carottier est placé perpendiculairement à la surface du sédiment (figure n° 8), de façon à ce que le piston repose sur ce dernier (a). Une force constante est exercée sur le cylindre de telle sorte qu'il s'enfonce d'une manière continue dans le sédiment.

° *Nous remercions vivement Monsieur DUVERGER, Docteur en Sciences de la Terre, assistant au Laboratoire d'Hydrogéologie de l'Université de BORDEAUX I, qui nous a conseillé pour le site et effectué lui même les prélèvements.*

La pression est interrompue lorsque le cylindre a totalement pénétré dans le sédiment, de ce fait le piston se trouve alors à l'extrémité supérieure du carottier (b).

Le piston et le cylindre sont alors retirés du sol en les maintenant solidaires l'un de l'autre. Dans ces conditions un cylindre de sédiment se trouve emprisonné dans le tube. L'ensemble est alors placé avec précaution dans un sac en polyéthylène pour éviter toute évaporation.

A L'arrivée au laboratoire, le carottier est placé horizontalement sur une table et une légère pression est exercée sur le piston pour dégager le sédiment. Au fur et à mesure de sa sortie la carotte est sectionnée au moyen d'un couteau en tronçon de 3 à 4 centimètres environ et le disque ainsi obtenu est placé dans un bécher numéroté (figure n° 9).

Figure n° 9 : Découpage de la carotte.

C'est sur ces sections de sédiment que nous avons effectué les dosages. Chaque disque est repéré par un numéro.

Pour la première carotte nous avons obtenu 16 disques et nous avons donné le numéro 1 au disque le plus proche de la surface et le disque numéro 16 correspond à la profondeur maximale atteinte par le carottier (environ 50 centimètres).

Compte tenu de la technique que nous avons utilisée, le premier disque qui sort du carottier est le disque le plus profond ; or comme il n'était à priori pas possible de prévoir le nombre de disques que nous obtiendrions nous avons attribué à ce premier disque la position A, pour le second la position B et ainsi de suite.

Une fois obtenus, tous les disques ont été numérotés en sens inverse de l'ordre alphabétique et nous avons attribué au dernier échantillon le numéro 1 tandis que le nème correspondait au disque A selon l'ordre suivant :

	P	O	N	M	L	K	J	I	H	G	F	E	D	C	B	A
Surface																
	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16

Pour la deuxième carotte nous avons obtenu 11 disques que nous avons numérotés de la même façon en donnant le numéro 1 au disque le plus proche de la surface, et le numéro 11 au disque correspondant à la profondeur maximale atteinte dans ce deuxième cas par le carottier c'est-à-dire environ 35 centimètres.

Sur ces disques nous avons opéré les mesures suivantes :

A - poids à l'état humide,

B - mesure du pH,

C - dosage des ions sulfures,

D - dosage des amino acides.

I - DIFFERENTES MESURES EFFECTUEES

A - Poids des différents disques :

Chacun des disques a été débarrassé à l'aide d'une pince, des vers et coquillages avant pesée. Cette dernière a été effectuée dans des béchers convenablement tarés. Les poids obtenus pour les différents disques de ces deux carottes ont été reproduits dans le tableau n° I.

TABLEAU N° I

POIDS DES DISQUES DE CHAQUE CAROTTE A L'ETAT HUMIDE

Disque	1ère carotte	2ème carotte
1	37,0 g	54,3 g
2	31,6 g	55,5 g
3	49,0 g	52,0 g
4	54,0 g	61,0 g
5	38,0 g	59,0 g
6	50,4 g	58,5 g
7	43,5 g	50,0 g
8	54,0 g	60,6 g
9	55,5 g	66,4 g
10	74,0 g	71,0 g
11	86,5 g	80,1 g
12	85,0 g	
13	82,0 g	
14	97,0 g	
15	80,0 g	
16	82,0 g	

Bien que le poids des différents disques ne revêt pas de signification particulière, nous remarquons qu'à des volumes sensiblement voisins correspondent des poids allant du simple au double ; ceci s'explique par le fait qu'au fur et à mesure que le disque provient d'un échantillon plus profond (son numéro est donc plus élevé), sa teneur en sable est beaucoup plus forte, augmentant ainsi sa densité.

B - Mesure du pH :

Le pH des différents disques a été réalisé par simple mesure potentiométrique (pH mètre Radiometer°). Cette mesure a été réalisée sur dix grammes de sédiment, prélevés sur chaque disque d'une carotte, additionnés de 10 ml d'eau bidistillée. La mesure du pH a été effectuée sur le surnageant après 24 heures de repos, les résultats obtenus ont montré que le pH était pratiquement constant et égal à 6,85 sur toute la hauteur de la carotte.

C - Dosage des ions sulfure :

a - Lors de la préparation des disques en vue du dosage des amino acides, une certaine quantité d'hydrogène sulfuré s'étant dégagée, caractérisé par son odeur, nous avons été amenés à réaliser le dosage de l'ion sulfure. Ce dosage a été réalisé par la méthode ampérométrique sur une émulsion obtenue à partir d'une aliquote du disque placée dans de l'eau distillée (1 gramme/500 ml). La méthode ampérométrique met à profit la réaction de l'ion sulfure d'argent (Ag_2S) très peu ionisé, selon la réaction :

$$S^{--} + 2\ Ag^{+} \rightarrow Ag_2S$$

Le terme de la réaction est caractérisé par l'élèvation brusque du courant dû à l'élèvation de la concentration en ion argent de la solution.

b - Le protocole expérimental est le suivant : la solution à analyser est placée dans une cellule électrolytique identique à celle utilisée par JENSEN pour le dosage du sélénium (24) et représentée sur la figure n° 10.

Deux électrodes, l'une formée d'une spirale de platine, l'autre par une pile au calomel plongeant dans la solution à analyser par un pont agar agar saturé par du chlorure de potassium, sont maintenues à un potentiel constant. Ce potentiel est celui de la pile au calomel et a une valeur de 0,2 Volt environ.

° *Radiometer AIS EMDRUPVEJ 72 DK 2400 COPENHAGUEN DANEMARK.*

Une microburette contient la solution titrante c'est-à-dire du nitrate d'argent 0,005 M. Le renouvellement de la solution autour de l'électrode de platine, indispensable pour le dosage ampérométrique, est obtenu en faisant tourner la solution à analyser au moyen d'un agitateur magnétique. Après chaque addition de réactif, l'intensité du courant qui traverse la cellule est lue au moyen d'un galvanomètre AOIP (type G 221) placé en série entre la cellule électrolytique et la pile au calomel, le montage est représenté sur la figure n° 10.

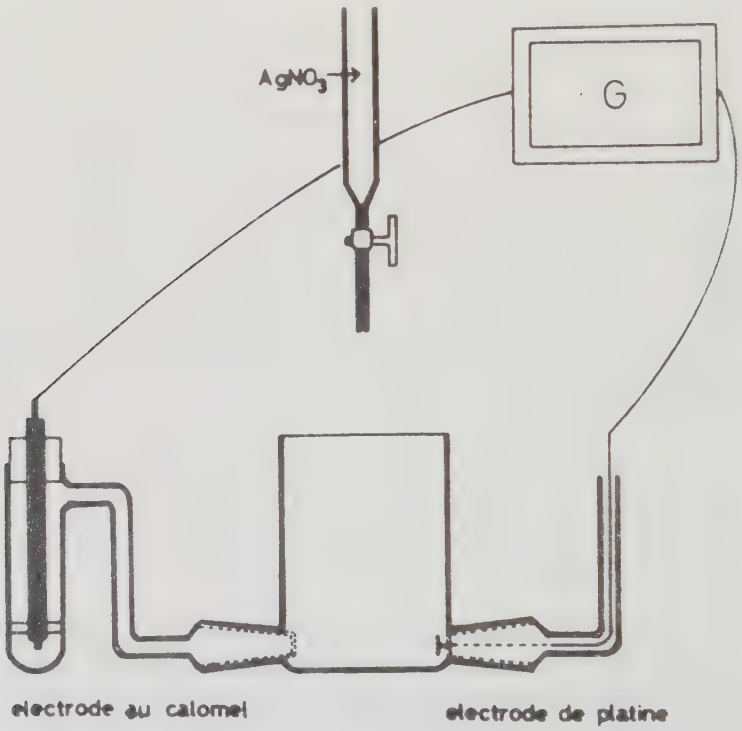


Figure n° 10 : Schéma du montage électrique de la cellule (C), de la pile au calomel (P) et du galvanomètre (G).

Le diagramme de mesure est obtenu en traçant en abscisse les volumes en ml de réactif ajoutés et en ordonnée la lecture galvanométrique en milliampères.

Ce diagramme se présente sous la forme de deux droites dont le point d'intersection correspond au point d'équivalence (figure n° 11).

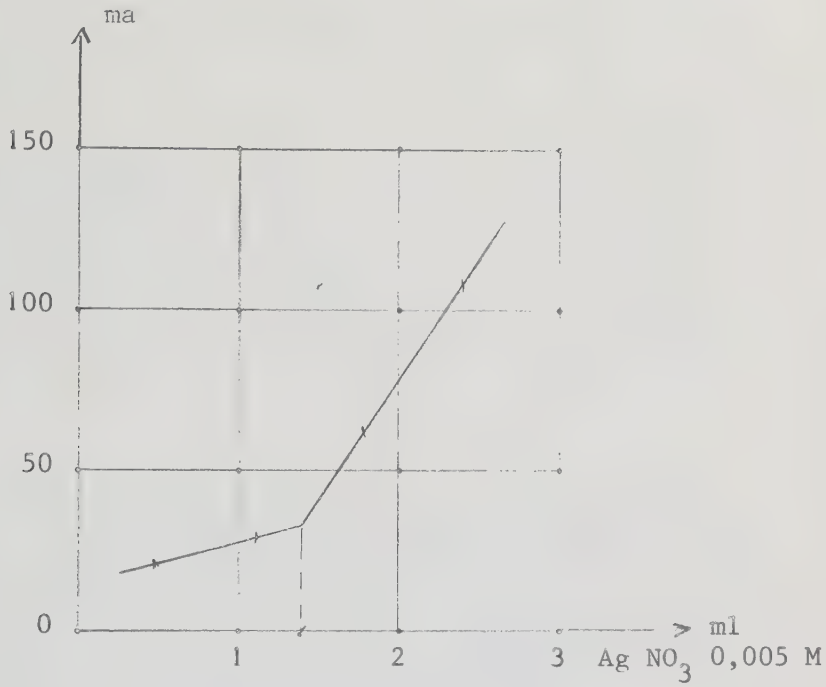


Figure n° 11 : Diagramme du dosage ampérométrique d'une solution contenant l'ion sulfure au moyen de nitrate d'argent.

Le potentiel de demi-onde de l'ion argent étant moins négatif que celui fourni par la pile au calomel, la lecture ampérométrique correspond bien à la réduction de l'ion argent se trouvant dans la solution. Le diagramme (figure n° 11) est composé de deux droites dont l'intersection correspond au point d'équivalence. La théorie (49) démontre que la première courbe correspond à la loi d'Ohm appliquée à un milieu dont l'ionisation n'évolue pas sensiblement (chaque ion argent arrivant dans la solution donne avec les ions sulfure un sulfure d'argent Ag_2S faiblement ionisé); la deuxième droite représente l'augmentation de l'intensité du courant due à l'afflux des ions argent qui ne sont plus

combinés, le point d'équivalence ayant été dépassé. En pratique il suffit d'avoir 2 points avant le point d'équivalence puis de le dépasser carrément par addition du réactif et d'obtenir deux ou trois points pour la deuxième droite. L'intersection de ces deux droites correspond au point d'équivalence. La précision obtenue est fonction de la solution utilisée. La sensibilité du dosage (très grande) ne dépend que du galvanomètre ; la spécificité est liée au réactif utilisé et au potentiel sous lequel est fait le dosage. La vitesse des mesures est relativement rapide, mais il est nécessaire de régénérer assez souvent l'électrode de platine car après un certain nombre de dosages, elle se recouvre d'un mélange d'ion argent et de sulfure d'argent qui modifie dans d'assez fortes proportions sa résistance et ses caractéristiques électriques.

c - Mode opératoire :

- Le vase réactionnel contient 30 ml de la solution à doser de façon à recouvrir les électrodes.

- L'électrode indicatrice est simplement constituée d'une spirale de platine (figure n° 10).

- La confection de la pile au calomel (figure n° 12) demande un soin particulier.

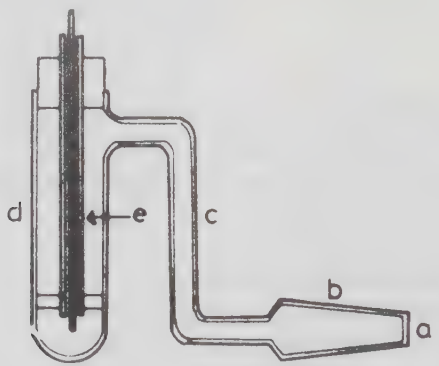


Figure n° 12 : Pile au calomel.

La pile au calomel est constituée d'une pièce en verre possédant à une extrémité un verre fritté (a) soudé sur un rodage mâle B_{12} (b) (Quickfit°), lui même raccordé à un tube en forme de S (c) de 5 mm de diamètre. La partie de ce tube opposée au rodage est soudée à la partie supérieure d'un tube de 15 mm de diamètre et de 5 cm de hauteur (d).

Cette pièce en verre sert de conducteur électrique entre la pile proprement dite et le vase réactionnel. Pour éviter la contamination due aux sels de mercure entrant dans la composition de cette pile, la jonction est réalisée à l'aide d'un pont d'agar agar°° solide saturé de KCl, coulé à chaud dans le tube en S (c) et le rodage (b). La pile au calomel est constituée par une couche de mercure surmonté de calomel ($Hg\ Cl_2$), humecté d'eau saturée de KCl.

Afin de pouvoir respecter la polarité de la pile, il est nécessaire de raccorder le mercure à la borne (+) du galvanomètre et le calomel à la solution. Le contact est réalisé à l'aide d'une borne particulière composée d'un tube de verre isolant (e) terminé par un clou de platine de petite dimension. Ce dernier plonge dans le mercure exclusivement et l'isolant empêche toute fuite de courant provenant du calomel vers le galvanomètre.

d - Le réactif :

Il est constitué d'une solution de nitrate d'argent 0,005 M :

Nitrate d'argent ..... 0,0849 g
H_2O bidistillée .....QSP 100 ml

° *QUICKFIT and QUARTZ Ltd, Stone, Staffordshire - England.*

°° *Agar agar ..... 3 g*
KCl saturé .....QSP 100 ml.

e - Expression des résultats :

Les résultats exprimés en milliéquivalents d'ion sulfure, sont reportés sur le tableau n° II, et concernent différents niveaux d'une carotte.

TABLEAU N° II

RESULTATS DU DOSAGE DE L'ION SULFURE

COUCHE	S^{--} en meq/g
Surface	0,035
- 20 cm	0,032
- 40 cm	0,031

Les résultats obtenus montrent que la quantité d'ion sulfure est pratiquement constante sur toute la hauteur de la carotte et en proportion relativement élevée.

D - Dosage des amino acides :

Les carottes de sédiment prélevées se composent en fait d'une partie solide représentée par le sédiment silico argileux et d'une partie liquide représentée par l'eau de mer d'imbibition ou de lessivage.

Nous avons procédé au dosage des amino acides dans ces deux phases.

1°) - Dosage des amino acides du sédiment :

La matière organique présente dans les disques de sédiment au niveau de la surface se trouve intimement liée aux particules fines et précolloïdes, elle provient des débris végétaux ayant subi un rouissage, ainsi que des déchets résultant des nombreux égouts qui se déversent dans le bassin ; les sables prennent la plupart du temps une couleur grisâtre qui serait probablement due à la présence d'un voile bactérien enrobant

chaque grain (BOUCHET (7)). Ceci nous a amené à penser que la matière organique azotée qui nous intéressait était d'origine très variée et se présentait soit sous forme d'amino acides libres, soit combinés sous forme de peptides ou même de protéines.

Les amino acides fixés sur la vase et élués en milieu acidé ont été analysés d'une part globalement sur une partie aliquote de l'éluat par la méthode de SATAKE (47) à l'acide trinitro benzène sulfonique et d'autre part de façon détaillée par chromatographie sur résine échangeuse d'ions. (Méthode de HAMILTON (15)).

Une première série de travaux a été réalisée en analysant la liqueur obtenue après hydrolyse chlorhydrique des disques de sédiment. Cette opération provoquant non seulement la libération des amino acides, mais aussi l'hydrolyse des peptides et protéines présents. L'hydrolyse chlorhydrique présente l'inconvénient de ne récupérer qu'environ 90 % des amino acides, elle entraine en particulier la disparition du tryptophane et la diminution de la cystéine. (CONNAN (11)).

Dans une seconde série de travaux, nous avons séparé d'une part les substances solubles à froid dans l'acide chlorhydrique c'est-à-dire les amino acides libres et les substances peptidiques solubles et d'autre part les substances azotées fixées sur le sédiment. Nous avons représenté sur la figure n° 13 le schéma du protocole opératoire de l'obtention des différentes fractions. Les trois fractions ainsi obtenues ont été analysées par la technique de SATAKE puis par la méthode chromatographique.

a - Obtention des solutions azotées :

α) - Amino acides totaux :

Les disques provenant d'une carotte placés dans un bécher, sont additionnés de 50 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Après désagrégation par passage dans l'appareil à ultra-sons, le contenu du bécher est transvasé dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux puis hydrolysé pendant 24 heures, à ébullition. Après

refroidissement et au repos, le liquide clair surnageant est filtré sur verre fritté puis évaporé à sec sous vide, à l'aide d'un évaporateur rotatif. Le résidu ainsi obtenu est repris par 50 ml d'eau bidistillée constituant la solution d'amino acides totaux A.

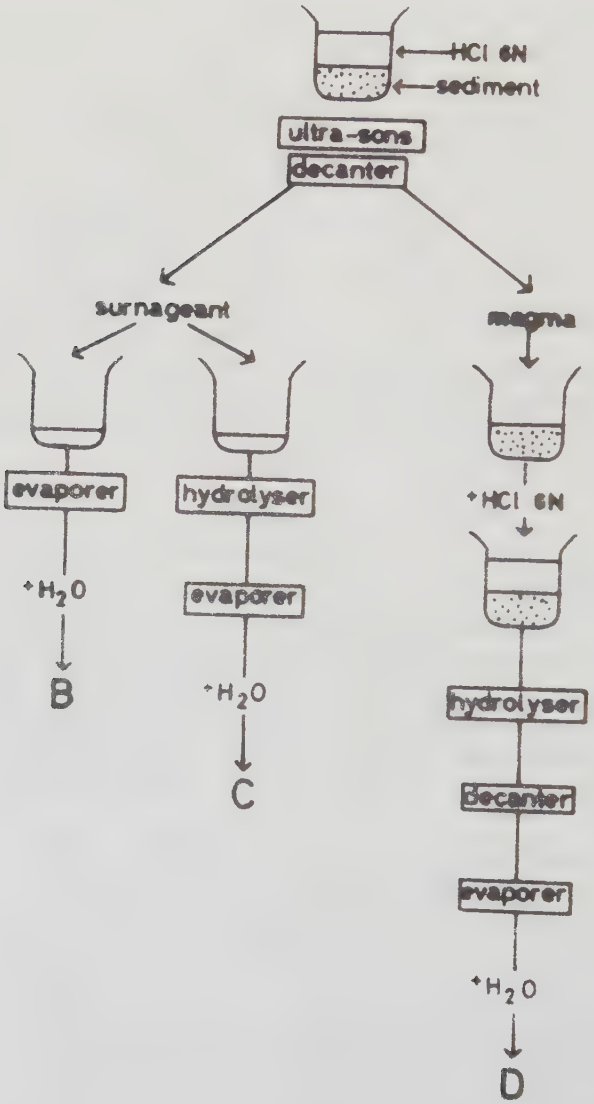


Figure n° 13 : Schéma de l'obtention des différentes fractions azotées.

β) - Amino acides libres :

Les disques d'une autre carotte sont placés de la même façon que les précédents, chacun dans un bécher numéroté et additionné de 50 ml d'acide chlorhydrique 6N. Ils sont désagrégés par passage dans l'appareil à ultra-sons pendant environ 2 minutes, en prenant soin d'éviter toute élévation de température pouvant hydrolyser les peptides présents dans le sédiment.

Le bécher est ensuite mis au repos, au frais, pendant près de 24 heures pour permettre une décantation car dans certains cas, le sédiment étant très fin (colloïdal) il est presque impossible de le séparer par filtration ou même centrifugation.

Le liquide clair, récupéré après décantation est transvasé dans une fiole jaugée de 50 ml et ajusté à 50 ml par les eaux de rinçage du sédiment (HCl 6N). Ces 50 ml de solution ainsi obtenus sont divisés en deux fractions de 25 ml chacune correspondant respectivement aux fractions B et C. Le sédiment récupéré après décantation constitue la fraction D.

La fraction B est évaporée à sec et reprise par 25 ml d'eau bidistillée constituant la solution B d'amino acides libres.

γ) - Fraction polypeptidique soluble :

La fraction C, contenant à la fois les amino acides libres et les amino acides combinés sous forme de polypeptides solubles, est hydrolysée 24 heures à ébullition sous réfrigérant à reflux. Après filtration sur verre fritté, le filtrat est évaporé à sec sous vide comme précédemment et repris par 25 ml d'eau bidistillée, nous obtenons ainsi la solution C.

δ) - Fraction protéidique insoluble fixée sur le sédiment :

Le sédiment obtenu après décantation de la fraction acide, est additionné de 50 ml d'HCl 6N, puis placé dans un ballon muni d'un réfrigérant à reflux hydrolysé 24 heures à ébullition. Après repos, le liquide clair est décanté et évaporé à sec sous vide, le résidu est repris par 50 ml d'eau bidistillée et constitue la solution D.

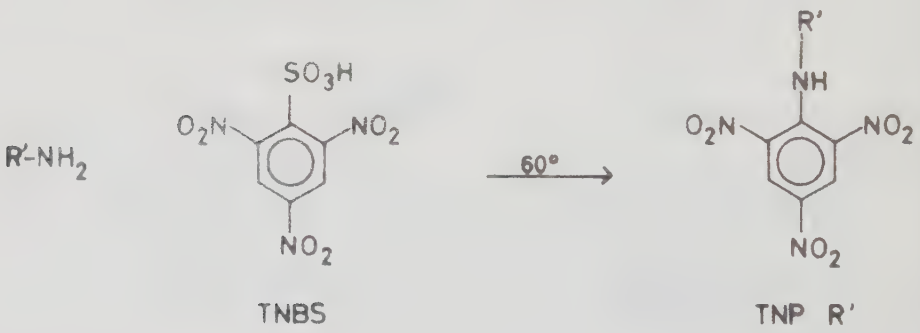
- Protocole opératoire d'analyse des amino acides :

[illegible] SATAKE :

Afin d'éviter une surcharge de la colonne échangeuse d'ions, nous avons effectué un dosage global des amino acides présents dans les solutions par la méthode de SATAKE (47).

Principe .

Cette méthode est plus couramment appelée méthode au T.N.B.S. (acide trinitro - 2, 4, 6 - benzène sulfonique) et repose sur la réaction suivante :



TNBS TNP R'

R' - NH_2 représente un amino acide.

T.N.B.S. : acide trinitro - 2, 4, 6 - benzène sulfonique.

T.N.P. - R' : dérivé trinitro phénylé.

Le T.N.B.S. ne réagit ni avec l'ammoniaque, ni avec l'urée et le fait qu'il réagisse avec d'autres groupements aminés que ceux des amino acides (amines primaires) ne présente pas d'inconvénient dans l'étude de nos hydrolysats.

Les acides aminés sont dosés colorimétriquement grâce à la réaction au T.N.B.S.. Les groupements aminés donnent en effet avec une solution de T.N.B.S. à pH 9,5 une coloration jaune orangée qui s'intensifie pendant la première demi-heure à la température de 40°. Par acidification du milieu la coloration passe au jaune et demeure très stable à l'obscurité. Son intensité peut donc être mesurée, à 420 mμ. L'échantillon à doser est dilué de façon à avoir une concentration de 0,001 à 0,8 µMole par millilitre.

- Réactifs :

- Carbonate acide de sodium à 4 %
  carbonate acide de sodium ..... 40 g
  eau bidistillée .....QSP 1000 ml

- Acide trinitro - 2, 4, 6 - benzène sulfonique à 0,1 %
  T.N.B.S. ..... 1 g
  eau bidistillée .....QSP 1000 ml
  réactif à garder à l'obscurité et au froid.

- Acide chlorhydrique N.

- Technique :

Il est indispensable d'établir une gamme étalon (tableau n° III), cette dernière se fait à partir d'une solution standard de 18 acides aminés (à 0,250 µM chacun) correspondant au total à 45 µM/ml et diluée au 1/100ème au moment de l'emploi. La réaction suit la loi de BEER-LAMBERT ; la lecture se fait au spectrophotomètre (UNICAM SP 600)° à la longueur d'onde de 420 mμ. La gamme étalon sert à tracer la droite d'étalonnage en plaçant en abscisse le nombre de micromoles d'amino acide par millilitre et en ordonnée la densité optique.

° *UNICAM SP 600 , Instruments LTD York street, CAMBRIDGE ENGLAND.*

Le dosage de l'échantillon est effectué dans les mêmes conditions.

TABLEAU N° III

GAMME ETALON DE LA METHODE DE SATAKE

TUBES	1	2	3	4	Blanc
Solution acide aminés à 45 µM/ml diluée au 1/100ème en ml	0,1	0,5	0,7	1	0
H_2O distillée en ml	0,9	0,5	0,3	0	1
Carbonate acide Na à 4 % en ml	1	1	1	1	1
T.N.B.S. à 0,1 % en ml	1	1	1	1	1
agiter et garder 2 heures au bain marie à 40° C					
HCl 1N en ml	1	1	1	1	1

- METHODE DE HAMILTON :

- Principe :

La méthode de HAMILTON (15) repose sur la séparation des amino acides par un gradient de tampons à pH croissant qui circule dans une colonne de résine échangeuse d'ions, propulsé par une pompe haute pression (100 à 200 psi[c]).

[c] *1 Bar : 14 psi.*

L'hydrolysat placé en tête de colonne est analysé en continu. Dans ce but une partie aliquote de l'éluat de la colonne est mélangée au réactif à la ninhydrine (réactif de coloration) puis après passage dans une bobine de verre placée dans un bain marie à 95°, la densité optique du flux est mesurée dans une cuve tubulaire, puis enregistrée. Le diagramme obtenu se présente sous forme de pics bien séparés, dont l'abscisse correspond au temps qui s'écoule entre le début de l'analyse et la sortie de l'amino acide.

La surface de chacun des pics est proportionnelle à la quantité de l'amino acide présente dans l'éluat. La méthode devient quantitative lorsque nous avons le soin d'ajouter à l'hydrolysat une quantité connue de norleucine servant d'étalon interne : nous comparons alors la surface du pic obtenu à celle du pic de la norleucine. Ensuite au moyen de coefficient de coloration (chaque amino acide a un coefficient propre (16) qui indique le rendement en pourpre de Ruheman par rapport à une même quantité de norleucine), il est possible de calculer la quantité de chaque amino acide contenu dans l'échantillon.

- Matériel : 1 - Colonnes :

Il est principalement constitué de deux colonnes différentes de résine échangeuse d'ions. La première colonne permettant une analyse en 6 heures et utilisée pour sa rapidité, mesure 75 cm de long et 0,65 cm de diamètre interne, elle est remplie d'une résine type Chromobeads C TECHNICON° de 13 µ de diamètre. La deuxième colonne fournissant une analyse en 16 heures 30 mesure 140 cm de long sur 0,65 cm de diamètre interne et contient une résine de type chromobeads B° de 20 µ de diamètre. Ces colonnes sont maintenues à 60° C par un bain marie à circulation.

2 - Autograd :

La variation constante et continue du pH de l'éluant est réalisé grâce à un appareil appelé Autograd °°

° *TECHNICON Coorporation Tarrytown New York U.S.A.*

°° *AUTOGRAD appareil à gradient continu fourni par TECHNICON°.*

qui est constitué de 9 chambres de 12,5 cm de long sur 1,5 cm de large et 8,5 cm de hauteur. Chaque chambre reçoit un volume identique de liquide d'élution constitué de tampons de pH différents ; un système de verrouillage empêchant toutes communications entre les chambres avant l'analyse est ouvert au moment de la mise en route. Ce système est constitué de vannes situées à la base de chaque chambre.
Le gradient de tampon est obtenu de la manière suivante : un volume de tampon de la première chambre est puisé par la pompe au temps zéro, de ce fait la chambre qui lui est contigüe va par la vanne ouverte lui transférer un volume tel que les niveaux des deux chambres soient identiques. Il en est de même de la troisième chambre, de la quatrième etc... Le passage du liquide d'une chambre à l'autre a pour effet d'élever le pH de la chambre de numéro inférieur et cela de manière continue. Un dispositif d'agitation formé de pâles assure le brassage des solutions tampons tout au long de l'analyse.

3 - Pompe :

L'éluant est puisé au sommet de la colonne à l'aide d'une pompe de type MILTON ROY[c]. Les pompes sont réglées de façon à ne pas excéder 100 à 250 psi. Le débit en sortie de colonne correspondant au système en 6 heures est alors fixé à 0,8 ml par minute et celui du système en 16 heures 30 à 0,5 ml par minute. Ce dernier comme nous pouvons le constater est plus faible, ceci pour retarder un éventuel colmatage de la résine en raison de la durée de l'analyse.

4 - Analyseur :

L'autoanalyseur[cc] est du type monocanal. Il est classiquement constitué au départ par une pompe proportionnante qui permet le prélèvement continu de l'éluant à sa sortie de colonne, du réactif, ainsi que de l'azote. Le mélange de l'éluat et de son réactif est segmenté par des bulles d'azote selon la méthodologie TECHNICON.

[c] *MILTON ROY, Losapro Milton Roy, Rue d'Edimburg, PARIS 8ème*

[cc] *AUTOANALYSEUR, analyseur automatique fourni par TECHNICON*

L'ensemble des tubes de pompage appelé manifold est celui employé pour l'analyse des amino acides sur colonne il a été légèrement modifié par nos soins et se compose de 5 tubes, (figure n° 14).

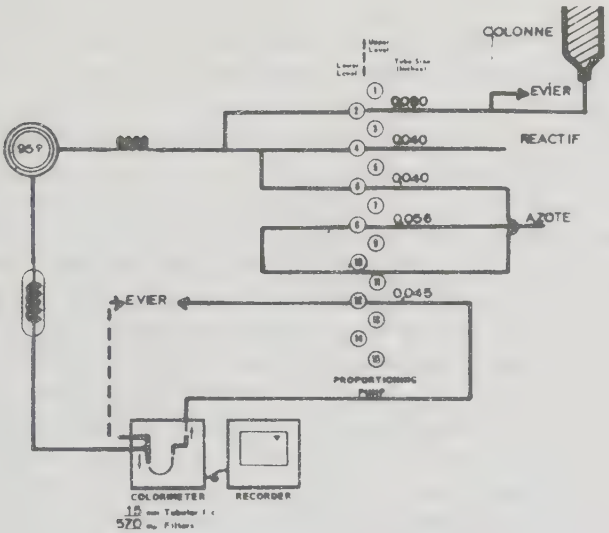


Figure n° 14 : Manifold utilisé pour l'analyse des acides aminés par chromatographie sur colonne. Légende voir texte.

1 - Tube CPV° noir, débit 0,32 ml/mn pour le pompage de l'échantillon ; mais étant donné que le débit de la colonne est de 0,8 ml/mn, nous constatons que le débit de la pompe proportionnante est nettement plus faible, c'est la raison pour laquelle nous avons placé en déviation sur le cathéter de jonction entre la colonne et la pompe proportionnante, un système simple d'évacuation (la sensibilité de la méthode est telle qu'on n'a pas besoin de la totalité de l'échantillon).

2 - Tube de pompage de la solution de ninhydrine en acidflex°° débit 0,56.

° *C.P.V. tube en chlorure de polyvinyl.*

°° *Acidflex (Tube très résistant aux acides).*

3 - Tube CPV blanc, débit 0,60 ml/mn pour l'azote sous la pression athmosphérique (régulateur de pression à bulles).

4 - Tube CPV jaune, débit 1,20 ml/mn raccordé au tube 4 permet de régulariser le débit d'azote en amont.

5 - Tube Sovaflex° rouge, débit 0,70 ml/mn pour le repompage de la cuve à flux continu.

Le mélange des réactifs avec l'éluat est réalisé dans des bobines de verre.

Le liquide réactionnel traverse un bain marie à huile maintenu à 95° C durant environ 15 minutes. En sortie du bain marie, un réfrigérant stoppe la réaction avant son entrée dans les colorimètres placés en série. L'un possède une cellule de lecture à 570 mμ pour les réactifs à la ninhydrine et le deuxième qui est équipé d'une cellule de lecture à 440 mμ pour la proline et l'hydroxyproline donnant une coloration jaune avec le réactif à la ninhydrine. Les cuves tubulaires sont de 15 mm. L'enregistreur qui transcrit les résultats est à deux canaux avec deux tracés simultanés. Le diagramme s'inscrit sur un papier graphique semi-logarithmique qui permet le calcul car les photomètres ne fournissent qu'un pourcentage de transmission.

- Les réactifs :

- Le réactif de coloration a pour composition :

- ninhydrine	4,0 g
- hydrindantine	0,3 g
- tampon acétate°°	70,0 ml
- méthylcellosolve pur	130,0 ml
- méthylcellosolve au demi avec eau bidistillée .....QSP	1 litre

° *Solvaflex (tube résistant non attaqué par le mélange de réactif.*

°° *Tampon acétate de sodium pH = 5,5 :*
acétate de sodium anhydre ..... 328 g
acide acétique glacial ..... 100 ml
eau bidistillée .....QSP 1 litre
on vérifie que le pH est bien à 5,5.

Ninhydrine et hydrindantine sont pesées dans une fiole conique de 250 ml, additionnées d'environ la moitié de méthylcellosolve pur et placées dans un appareil à ultra-sons jusqu'à complète dissolution. La solution limpide obtenue est transvasée dans une bouteille en verre fortement teinté ; la fiole est rincée avec le méthylcellosolve pur restant ; puis on ajoute le méthylcellosolve au demi et le tampon acétate. L'ordre d'addition des produits indiqué précédemment est impératif pour une bonne dissolution de la ninhydrine et de l'hydrindantine. La solution ainsi obtenue est immédiatement placée sous azote et peut être utilisée pendant une dizaine de jours sans perdre ses qualités°.

Le liquide d'élution est constitué par l'ensemble des tampons de différents pH ; il est appelé gradient, sa composition est différente selon la durée du système éluant. Dans le tableau IV, nous donnons la composition des chambres du gradient utilisée pour une analyse en 6 heures. Les volumes sont exprimés en millilitres et identiques dans chacune des chambres.

TABLEAU IV

GRADIENT DES TAMPONS
SYSTEME EN 6 HEURES
Volumes en ml

Chambres	Tampon A pH 2,75	Tampon B pH 2,9	Tampon C pH 3,8	Tampon D pH 10	Méthanol	Thiodiglycol
1	36				4	0,4
2		40				0,4
3		40				0,4
4		2,6	37,4			0,4
5			40			0,4
6				40		
7				40		
8				40		
9				40		

° *Il est cependant nécessaire d'avoir un méthylcellosolve d'excellente qualité, exempt de Cu, nous utilisons le produit de MERCK : ether diméthylique de l'éthyléneglycol, réf. 800 856 (DI 428).*

Dans le tableau V nous avons reproduit la composition du gradient pour le système en 16 heures 30.

TABLEAU V

GRADIENT DU SYSTEME EN 16 heures 30
Volumes en ml

Ch.	Tampon A' pH 2,7	Tampon B' pH 2,9	Tampon C' pH 3,8	Tampon E' pH 5	Tampon F' pH 6,1	Méthanol CH_3OH	Thiodiglycol
1	67,5					7,5	0,75
2	25	47,5				2,5	0,75
3		75					0,75
4			75				0,75
5			25	50			0,75
6				35	40		
7					75		
8					75		
9					75		

- Composition des tampons :

- 1er groupe A - B - C :

Citrate de sodium ..... 14,71 g
Soude 2 N ..... 25,00 ml
Solution brij° à 30 % ... 10,00 ml
Eau bidistillée .....QSP 1 litre

ajuster au pH désiré avec de l'acide chlorhydrique 6 N.

Ces différents tampons ne diffèrent entre eux que par le pH.

- 2ème groupe D - E :

- Composition du tampon D :

NaCl..... 128,50 g
Citrate de sodium ..... 14,71 g
Soude 2 N ..... 25,00 ml
Solution de brij ..... 10,00 ml
Eau bidistillée .....QSP 1 litre

ajuster à pH désiré avec l'acide chlorhydrique 6 N

° *Solution de Brij 35 : 30 g QSP 100 ml d'eau bidistillée.*

- Composition du tampon E :

NaCl.....	128,50 g	ajuster au pH 6,10
Citrate de sodium.....	14,71 g	avec de l'acide
Soude 2 N.....	25,00 ml	chlorhydrique 6 N
Eau bidistillée.....QSP	1 litre	

Ce groupe diffère du premier par l'adjonction de ClNa en concentration différente selon le tampon. L'augmentation de la force ionique a pour but d'accélérer l'élution des amino acides comme Tyr et Phe amino acides basiques (25).

La préparation de ces tampons nécessite des précautions particulières pour éviter la contamination par l'ammoniaque et les bases volatiles toujours présentes dans les réactifs et dans l'atmosphère. Elles ont pour inconvénients d'augmenter la densité optique de la ligne de base et de diminuer la sensibilité.

D'une manière générale le chlorure de sodium et le citrate sont placés dans un bécher de 2 litres avec environ 850 ml d'eau bidistillée. Nous ajoutons la solution de soude décarbonatée. L'ensemble est porté à ébullition sur une plaque électrique pendant 30 minutes.

Les conditions de pH et de température sont telles que les ions ammonium sont transformés en ammoniac volatil et disparaissent pour la majeure partie. Après refroidissement à la température ambiante à l'abri de l'air, nous transvasons le tout dans une fiole jaugée de 1 litre munie dans sa partie latérale d'un diverticule à l'extrémité duquel se trouve un rodage correspondant au rodage de l'électrode mixte destinée à la mesure du pH.

Un agitateur magnétique permet d'homogénéiser la solution pendant l'addition de l'acide, la présence de l'électrode de mesure dans le tampon nous donne à chaque instant la valeur du pH. Lorsque le pH désiré est atteint, nous complétons au trait de jauge par de l'eau bidistillée.

Ce type de tampon peut se conserver assez longtemps sans variations de pH tout au moins jusqu'à ce qu"il pousse", à partir de ce moment il n'est plus utilisable et doit être rejeté. Des agents conservateurs peuvent être ajoutés : pentachlorophénol etc..., mais en réalité il est préférable de faire des petites quantités de tampon chaque semaine et de les conserver à basse température.

Une mention particulière doit être faite pour les pH : en effet ceux-ci doivent être mesurés avec un pH mètre de grande sensibilité au 1/1000 d'unité pH. Mais en réalité le plus important n'est pas la valeur absolue du pH mais le pH du tampon permettant la meilleure séparation, c'est ainsi que par exemple thréonine et sérine peuvent être beaucoup mieux séparées par une modification du tampon 2,90 de 1/100 d'unité pH.

Mode opératoire :

Le protocole utilisé est le suivant :
les deux systèmes employés sont mis en circuit alternativement. Le système réalisant une analyse en 6 heures fonctionne de 10 heures à 16 heures. Le système réalisant une analyse en 16 heures 30 fonctionnera de 17 heures 30 à 9 heures 30 le lendemain matin. Ces horaires permettent la régénération et l'application des échantillons sans problème de continuité

La régénération :

Après chaque analyse les résines sont régénérées par une solution de soude N/20, durant 20 minutes pour la petite colonne (75 cm) et 40 minutes pour la grande colonne (140 cm) ; puis les résines sont rééquilibrées par du tampon à pH 3,10 durant 30 minutes pour la petite colonne (75 cm) et par du tampon à pH 2,75 durant une heure pour la grande colonne (140 cm).

Environ une heure avant la mise en place de l'échantillon en tête de colonne, le réactif à la ninhydrine est mis en circuit ; les colorimètres et l'enregistreur sont mis en marche, ceci ayant pour but d'une part de vérifier le zéro de l'enregistreur, et d'autre part d'obtenir une ligne de base parfaitement stable.

Application de l'échantillon :

L'échantillon à analyser est constitué d'une solution aqueuse d'amino acides. Il est impératif que cette solution se trouve en pH 1 à pH 2, car à un pH différent les amino acides ne pourraient être fixés sur les premiers millimètres de résine.

L'application de l'échantillon doit être précédée de l'addition d'une quantité déterminée de norleucine qui va servir d'étalon interne : un millilitre de solution à analyser est additionné de 0,250 micromole de norleucine, le mélange des deux solutions est réalisé avec le maximum de précision.

L'application proprement dite de l'échantillon contenant la norleucine, est effectuée à l'aide d'une seringue à longue aiguille (les meilleures sont les seringues HAMILTON° au 1/100 de ml).

Après avoir débranché la tête de colonne, le tampon qui se trouve au dessus de la résine est aspiré puis à l'aide de la seringue de HAMILTON nous plaçons le plus doucement possible le volume de solution appropriée (entre 0,5 et 0,8 ml). A l'aide d'azote sous pression (2 bars environ) l'échantillon pénètre dans la résine. Il est important d'éviter de "sécher" la partie supérieure de la résine car dans ce cas la séparation n'est pas correcte.

Lorsque la solution est presque totalement introduite, la paroi de la colonne est rincée par quelques gouttes d'eau à pH 1 et ce liquide pénètre à son tour dans la résine par pression.

Cette seconde opération étant terminée, (durée totale 30 mn), la résine est recouverte de tampon 2,75 ou 3,10 selon le système utilisé 6 heures ou 16 heures 30, sans en perturber la partie supérieure. La pompe haute pression est remise en marche en prenant soin de purger le circuit de toutes les bulles d'air qui pourraient s'y trouver. Enfin nous replaçons la tête de colonne.

Pour le gradient de tampon, nous nous servons d'un système à 9 chambres communicantes appelé autograd que nous avons décrit page 48 ; chaque vanne communicante est fermée pour permettre le remplissage dans l'ordre des différentes chambres par les tampons selon la formulation mentionnée page 52 ; la première chambre est celle qui est reliée directement à la pompe.

Après s'être assuré par la surveillance du manomètre, que le liquide de pompage était bien pulsé au sommet de la colonne, nous procédons à l'ouverture des chambres de l'autograd et par le jeu de robinets à trois voies (permettant soit l'arrivée de la soude de régénération soit du tampon de rééquilibration, soit du gradient) nous faisons arriver au sommet de la colonne le gradient

° *HAMILTON micromesure B.V.*
P.O. Box 205 The Hague Holland.

préparé extemporanément et correspondant au système choisi (6 heures ou 16 heures 30).

Sur le papier enregistreur réglé à la vitesse de déroulement de 3 "inches" à 1'heure, nous notons le départ de l'analyse. En même temps nous mettons en marche un intégrateur° : il possède l'avantage de simplifier considérablement les calculs comme nous le verrons page 59.

Etant donné que la pompe proportionnante fonctionne 24 heures sur 24, il est indispensable de changer les tubes du manifold une fois par semaine.

L'interruption des analyses en fin de semaine est suivie d'un lavage du circuit analytique au méthylcellosolve dilué au demi pour enlever les dépots d'hydrindantine et d'acétate de sodium qui auraient pu se former, puis on termine par un rinçage à l'eau distillée additionnée d'un peu de solution de Brij à 30 %.

Lors d'un encrassage par le pourpre de Ruheman de la cuve tubulaire, caractérisé par une montée de la ligne de base, l'ensemble est rincé à l'acide acétique dilué au demi.

2°) - Dosage des amino acides de l'eau de mer :

Nous avons ensuite fait l'analyse de l'eau de mer qui se trouve en contact avec le sédiment. Cette analyse a pour but d'analyser seulement dans les mêmes conditions que le sédiment, les amino acides contenus d'une part dans l'eau de lessivage et d'autre part dans l'eau d'imbibition du sédiment silico-argileux étudié.

Ces eaux de lessivage et d'imbibition ont été prélevées en même temps et au même endroit que les carottes de sédiment.

- Protocole opératoire :

Nous avons placé 50 millilitres d'eau de mer additionnée de 50 millilitres d'acide chlorhydrique 6 N, à hydrolyser, dans un ballon surmonté d'un réfrigérant à reflux, à ébullition pendant 24 heures.

° *Infotronics type CRS 11 AD/HS 42.*

Nous avons tout d'abord effectué une analyse des amino acides totaux par la méthode de SATAKE (voir page 44). Nous avons ensuite procédé à une analyse détaillée par la méthode chromatographique (voir page 46). Pour cela et étant donné la faible concentration des amino acides présents dans l'eau de mer, il a fallu reprendre le résidu d'hydrolyse après évaporation à sec par un minimum de 10 millilitres d'eau bidistillée. Il ne nous a pas été possible de concentrer davantage l'hydrolysat d'eau de mer car la présence du ClNa donne très vite un aspect sirupeux à la solution, incompatible avec l'analyse sur colonne de résine. D'autre part nous n'avions pas au laboratoire la possibilité de dessaler l'eau de mer. De ce fait nous avons perdu une partie de la sensibilité.

III - METHODES DE CALCUL

Nous avons tenu à mentionner ici les méthodes de calcul des chromatogrammes obtenus lors du dosage des amino acides par la méthode chromatographique. Ces chromatogrammes présentent une série de pics bien séparés dont l'ordonnée correspond à la densité optique et l'abscisse au temps de sortie. Chaque pic correspond à un amino acide déterminé et sa surface est proportionnelle à sa quantité présente dans l'échantillon.

1°) - Méthode d'intégration manuelle :

Cette méthode ne présente, en théorie tout au moins, aucune difficulté. En effet pour un pic dont l'ordonnée est proportionnelle à la concentration, il suffit de mesurer la surface du rectangle obtenu pour un volume déterminé d'éluat (figure n° 15).

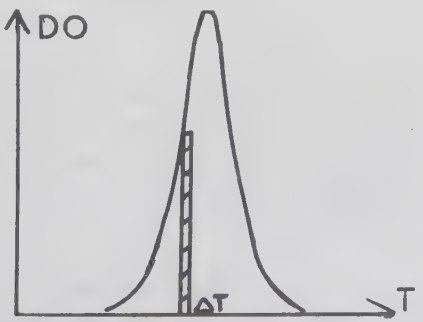


Figure n° 15 : Principe de l'integration d'un pic.

En faisant la sommation de chacun de ces rectangles, nous pouvons avoir une valeur de la quantité d'amino acides présente dans le pic considéré.

La difficulté réside dans le fait que l'ordonnée pour l'appareillage TECHNICON n'est qu'une valeur du pourcentage d'absorption et que seul le logarithme de cette valeur est proportionnel à la concentration (loi de BEER LAMBERT). Il est donc nécessaire pour calculer la surface des rectangles de redessiner à nouveau le pic en transformant le pourcentage d'absorption en densité optique. Il est plus simple d'utiliser le calcul proposé par HAMILTON (16) : dans le cas de l'utilisation d'un papier semi-logarithmique, la surface du pic exprimé en unité de densité optique est obtenue par le produit de la hauteur du pic en densité optique par sa largeur mesurée à mi-hauteur à l'aide d'une loupe micrométrique. Sur la figure suivante (figure n° 16) nous avons représenté l'intégration d'un pic.

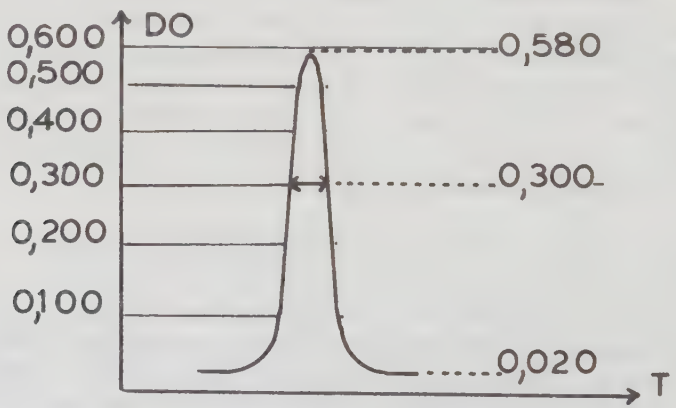


Figure n° 16 : Exemple d'intégration d'un pic.

Dans un premier temps nous lisons directement la densité optique de la ligne de base = 0,020 et du sommet du pic = 0,580, nous en déduisons la hauteur du pic = 0,560, puis nous calculons la demi hauteur du pic exprimé en densité optique = 0,280. A cette demi-hauteur nous ajoutons la valeur de la ligne de base ce qui donne 0,300. Nous obtenons ainsi l'ordonnée en densité optique du point où nous devons mesurer la largeur.

Le produit de la hauteur du pic par la largeur donne un chiffre proportionnel à la quantité d'amino acides.

Cependant pour éviter des erreurs qui peuvent être dûes au fait que chaque amino acide n'a pas un rendement identique en pourpre de Ruheman, nous appliquons au résultat obtenu un coefficient calculé à partir des résultats exprimés par HAMILTON (exemple : pour l'acide aspartique le coefficient est 1,017). Afin de pallier les modifications qui peuvent atteindre tout le circuit analytique au point de vue rendement de coloration, nous nous servons d'un étalon interne: la norleucine, dont une quantité connue a été appliquée en tête de colonne ; seul le rapport entre les amino acides et la norleucine est précis et garde la même valeur tout au long de l'analyse quelles que soient les conditions d'application de l'échantillon.

En pratique, nous déterminons la surface du pic de la norleucine et calculons la quantité de norleucine qui correspond à la valeur 1 (arbitraire) de la surface du pic, il suffit de multiplier le coefficient ainsi obtenu (appelé rendement coloré de la norleucine) par la surface de chacun des pics puis par le coefficient de chaque amino acide pour avoir en µMoles la quantité d'amino acides.

$\frac{0{,}250 \times 1}{\text{Surface Nor}}$ = rendement coloré de la Norleucine :

Si nous appelons R le rendement coloré de la Norleucine pour un amino acide A nous aurons :

Surface de A x R x coefficient de A = quantité de A en µMoles

2°) - Méthode d'intégration automatique :

L'intégrateur Infotronics branché sur le circuit analytique, est un appareil de type CRS 11 AD/HS 42° réglé sur l'analyse des amino acides. Il imprime sur une bande de papier : le temps de sortie en minute du sommet de chaque pic ainsi qu'un chiffre représentant le total des impulsions électriques mises en jeu au cours de l'intégration du pic. Ces impulsions correspondent à la sommation des produits de l'ordonnée du point par le temps de rétention. L'intégration débute pour chaque pic lorsque la tangente à la courbe passe d'une valeur nulle à une valeur positive, le sommet du pic est déterminé lorsque la valeur

° *Construit a Infotronics corp. Houston - Texas (U.S.A.).*

de la tangente passe du positif au négatif, l'intégration s'arrête lorsque la tangente passe d'une valeur négative à une valeur nulle. Toutes ces opérations sont réalisées automatiquement.

L'abscisse du sommet est mise en mémoire et imprimée en même temps qu'un nombre exprimé en unité arbitraire mais proportionnel à la surface du pic, (densité optique multipliée par le temps).

La connaissance de la valeur de la quantité de norleucine mise en jeu permet comme dans le cas précédent de calculer la valeur correspondante à une unité de surface. Une règle de trois conduit au résultat par la formule suivante :

$$\frac{0{,}250 \times 1}{\text{Chiffre Nor}} = \text{rendement coloré de la Norleucine : R}$$

Pour un amino acide A nous calculerons de la manière suivante

Chiffre de A x R x coefficient de A = quantité de A en µMoles

De cette façon nous avons pu obtenir tous les chromatogrammes, les quantités de chaque amino acide contenu dans chaque échantillon.

CONCLUSION :

Dans ce premier chapitre nous avons au cours d'une introduction précisé le lieu et la technique de prélèvement des échantillons.

Dans une deuxième partie, nous avons donné les différentes mesures effectuées en précisant pour chacune d'elle les techniques employées. Ces mesures sont les suivantes : poids des différents disques, mesure du pH, dosage des ions sulfure, dosage des amino acides dans le sédiment et dans l'eau de mer.

Enfin dans une troisième partie nous avons mentionné les méthodes de calculs des chromatogrammes obtenus lors du dosage des amino acides par la méthode chromatographique.

° °

°

CHAPITRE II

RESULTATS DE L'ANALYSE DES SEDIMENTS RECENTS DU BASSIN D'ARCACHON

Les résultats des dosages d'amino acides présents dans les sédiments récents du bassin d'ARCACHON et dans l'eau de mer imbibant ces sédiments, ont été calculés à partir d'une série de chromatogrammes réalisés par la méthode chromatographique et que nous avons décrite en détail page 46.

Etant donné les qualités de résines employées : chromobeads B (20 µ) et chromobeads C (13 µ) et surtout du matériel analytique (TECHNICON amino acides 1er appareil) nous n'avons pu séparer que les 18 amino acides "classiques' d'un hydrolysat. Il en résulte que nous n'avons indiqué dans les tableaux de résultats que ces amino acides à l'exclusion de certains autres qui se trouvent en réalité dans ces milieux naturels.

Dans ce chapitre nous ferons une récapitulation des résultats obtenus au cours des nombreux dosages, puis nous analyserons dans une discussion l'évolution des quantités d'amino acides contenus dans les différentes fractions au sein du sédiment et nous tenterons de leur donner une signification.

1 - COMPOSITION DU SEDIMENT EN AMINO ACIDES

- METHODE CHROMATOGRAPHIQUE :

Afin de pouvoir suivre l'évolution quantitative de la concentration de chaque amino acide selon la profondeur du sédiment, nous avons analysé chaque disque préparé selon la méthode décrite page 32.

Dans une première série d'analyse, nous avons effectué un seul chromatogramme sur chaque disque après hydrolyse selon la méthodologie mentionnée page 46.
Les chromatographies ont été réalisées par la méthode dite en 6 heures avec une colonne de 75 cm x 0,65 cm et une résine type Chromobeads C.

Les résultats obtenus pour la première carotte nous ont amené à modifier sensiblement le protocole tant sur le nombre de fractions à partir de chaque disque (3 fractions ont été analysées : B fraction amino acides libres, C fraction polypeptidique soluble, D fraction protéidique fixée), que sur le nombre de chromatogrammes (un en 6 heures et un en 16 heures 30).

Les raisons de ces modifications qui d'ailleurs rendent difficile les comparaisons entre les résultats des deux carottes, sont motivées par différents facteurs.
D'une part le premier protocole ne permettait pas de distinguer les polypeptides des amino acides libres.
D'autre part la technique en 6 heures séparait assez mal la thréonine de la sérine. Enfin, la pression utilisée jointe à la nature même de l'hydrolysat encrassait la colonne provoquant une nouvelle augmentation de pression et ainsi de suite ; le reconditionnement de la colonne devenait alors nécessaire.

Les résultats que nous rapportons sur les tableaux VI page 63 et VII pages 64 et 65 correspondent d'une part à l'analyse des amino acides de la première carotte (16 disques) et d'autre part à l'analyse des amino acides de la deuxième carotte (11 disques).

Ces résultats sont exprimés en µMoles d'amino acides par gramme de sédiment.

TABLEAU VI

COMPOSITION DU SEDIMENT EN AMINO ACIDES
METHODE CHROMATOGRAPHIQUE
RESULTATS RELATIFS A LA PREMIERE CAROTTE (16 DISQUES)
FRACTION A EN µM/g

Disques n°	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
1. Cyst	0,083	0,229	0,182	0,037	0,096	0,076	0,057	0,103	0,063	0,052	0,037	0,068	0,063	0,018	0,000	0,000
2. Asp	2,655	4,968	3,065	3,006	1,053	1,350	1,326	2,074	1,734	1,334	0,954	0,770	1,098	0,457	0,479	0,280
3. Thr	2,045	3,316	1,472	2,190	0,867	0,974	0,923	1,372	1,085	0,618	0,620	0,637	0,766	0,298	0,313	0,232
4. Ser	1,019	1,662	0,731	1,095	0,418	0,436	0,455	0,685	0,542	0,308	0,309	0,270	0,315	0,137	0,143	0,130
5. Glu	2,336	5,273	2,370	2,723	0,872	1,107	1,012	1,910	1,343	1,034	0,709	0,547	0,831	0,296	0,333	0,237
6. Gly	1,213	8,616	4,537	4,079	1,551	1,805	1,639	2,872	2,441	1,679	1,132	1,922	1,333	0,517	0,576	0,483
7. Ala	1,778	3,082	1,396	1,489	0,749	0,853	0,760	1,060	0,977	0,565	0,471	0,397	0,477	0,226	0,233	0,202
8. Val	0,599	1,520	0,784	0,673	0,307	0,343	0,304	0,576	0,498	0,356	0,222	0,199	0,294	0,087	0,098	0,085
9. Cys	1,094	2,330	1,142	0,986	0,589	0,413	0,445	0,713	0,671	0,543	0,475	0,475	0,362	0,220	0,243	0,188
10. Met	0,263	0,608	0,335	0,194	0,123	0,177	0,109	0,257	0,159	0,124	0,092	0,061	0,088	0,036	0,022	0,023
11. Ile	0,218	0,757	0,281	0,283	0,166	0,165	0,160	0,208	0,153	0,115	0,156	0,066	0,081	0,033	0,016	0,067
12. Leu	0,842	2,204	0,838	0,855	0,359	0,416	0,369	0,413	0,425	0,278	0,222	0,130	0,186	0,102	0,082	0,108
13. Tyr	0,349	0,739	0,381	0,466	0,140	0,183	0,155	0,307	0,191	0,113	0,109	0,070	0,063	0,030	0,022	0,024
14. Phe	0,691	1,218	0,587	0,772	0,265	0,292	0,290	0,427	0,347	0,408	0,232	0,175	0,227	0,117	0,114	0,093
15. Lys	1,130	2,856	1,025	1,896	0,456	0,437	0,394	0,687	0,677	0,586	0,315	0,256	0,327	0,156	0,152	0,127
16. His	0,180	0,355	0,202	0,472	0,075	0,086	0,094	0,168	0,150	0,119	0,055	0,042	0,057	0,026	0,031	0,028
17. Arg	0,916	1,852	0,989	0,296	0,385	0,411	0,369	0,638	0,584	0,451	0,280	0,223	0,301	0,139	0,137	0,114
18. Orn	0,072	0,163	0,088	0,056	0,033	0,035	0,046	0,066	0,047	0,055	0,031	0,033	0,354	0,017	0,017	0,015

Dans les résultats relatifs de la deuxième carotte de sédiment (11 disques), la valeur obtenue pour chaque amino acide représente la moyenne des chiffres calculés à partir des deux chromatogrammes. Les concentrations sont exprimées en µMoles d'amino acides par gramme de sédiment.

TABLEAU VII

COMPOSITION DU SEDIMENT EN AMINO ACIDES
METHODE CHROMATOGRAPHIQUE
RESULTATS RELATIFS A LA DEUXIEME CAROTTE
FRACTIONS B, C ET D, DISQUES 1 A 5 EN µM/g

Disques n°	1			2			3			4			5		
Fractions	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D
1. Cyst	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
2. Asp	0,000	0,262	1,610	0,027	0,191	0,720	0,054	0,274	1,134	0,014	0,384	1,220	0,107	0,646	1,330
3. Thr	0,000	0,031	0,773	0,012	0,111	0,333	0,029	0,156	0,605	0,049	0,171	0,418	0,056	0,273	0,449
4. Ser	0,000	0,253	0,938	0,021	0,123	0,405	0,051	0,182	0,721	0,065	0,220	0,598	0,070	0,312	0,568
5. Glu	0,000	0,372	1,509	0,033	0,156	0,432	0,064	0,249	0,980	0,054	0,294	1,016	0,096	0,481	1,210
6. Gly	0,000	0,641	3,238	0,328	0,478	1,368	0,217	0,750	2,201	0,207	0,778	1,679	0,405	0,933	1,533
7. Ala	0,000	0,146	1,472	0,060	0,162	0,504	0,019	0,207	1,192	0,025	0,226	0,868	0,067	0,312	0,813
8. Val	0,000	0,073	1,104	0,069	0,072	0,432	0,042	0,144	0,827	0,057	0,190	0,713	0,059	0,225	1,608
9. Cys	0,000	0,067	0,267	0,000	0,069	0,171	0,054	0,109	0,231	0,049	0,106	0,147	0,076	0,163	0,263
10. Met	0,000	0,174	0,561	0,030	0,057	0,234	0,000	0,083	0,211	0,000	0,073	0,066	0,000	0,124	0,500
11. Ile	0,000	0,058	0,708	0,000	0,042	0,261	0,000	0,086	0,519	0,000	0,076	0,467	0,000	0,107	0,373
12. Leu	0,000	0,098	1,352	0,000	0,078	0,477	0,038	0,150	0,865	0,027	0,163	0,737	0,034	0,247	0,771
13. Tyr	0,000	0,043	0,396	0,000	0,027	0,081	0,000	0,042	0,183	0,000	0,030	0,147	0,000	0,045	0,161
14. Phe	0,000	0,043	0,736	0,000	0,042	0,279	0,000	0,109	0,490	0,000	0,084	0,442	0,014	0,174	0,491
15. Lys	0,000	0,119	0,920	0,012	0,066	0,405	0,000	0,131	0,702	0,000	0,128	0,549	0,020	0,169	0,584
16. His	0,000	0,089	0,230	0,009	0,018	0,108	0,000	0,030	0,135	0,000	0,027	0,131	0,000	0,045	0,093
17. Arg	0,000	0,116	0,819	0,000	0,060	0,342	0,000	0,109	0,509	0,000	0,122	0,442	0,000	0,158	0,440
18. Ser	0,000	0,024	0,120	0,600	0,027	0,108	0,000	0,019	0,087	0,000	0,030	0,057	0,025	0,031	0,076

TABLEAU VIII

COMPOSITION DU SEDIMENT EN AMINO ACIDES
METHODE CHROMATOGRAPHIQUE
RESULTATS RELATIFS A LA DEUXIEME CAROTTE
FRACTIONS B, C ET D, DISQUES 6 A 11 EN µM/g

6			7			8			9			10			11		
B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D	B	C	D
0,000	0,000	0,000	0,050	0,017	0,000	0,068	0,038	0,000	0,028	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000	0,000
0,161	0,758	1,324	0,209	0,017	0,740	0,180	0,838	0,602	0,180	0,730	0,290	0,091	0,221	0,154	0,052	0,124	0,035
0,453	0,382	0,547	0,053	0,193	0,240	0,120	0,328	0,223	0,035	0,235	0,117	0,026	0,135	0,089	0,012	0,056	0,013
0,104	0,419	0,692	0,126	0,262	0,300	0,115	0,396	0,289	0,068	0,290	0,211	0,065	0,156	0,100	0,031	0,062	0,021
0,113	0,594	1,110	0,183	0,452	0,620	0,164	0,683	0,429	0,128	0,575	0,222	0,082	0,226	0,128	0,033	0,099	0,027
0,569	1,497	2,067	0,976	0,777	0,740	0,653	1,439	0,941	0,490	0,990	0,335	0,277	0,357	0,394	0,124	0,188	0,039
0,096	0,541	1,170	0,143	0,309	0,380	0,134	0,491	0,454	0,105	0,373	0,158	0,652	0,165	0,133	0,050	0,070	0,021
0,110	0,368	0,880	0,146	0,246	0,480	0,175	0,371	0,446	0,118	0,293	0,211	0,058	0,186	0,063	0,015	0,054	0,007
0,104	0,096	0,265	0,139	0,083	0,140	0,139	0,183	0,223	0,083	0,143	0,094	0,058	0,068	0,058	0,021	0,031	0,015
0,074	0,139	0,265	0,050	0,090	0,100	0,046	0,161	0,107	0,038	0,088	0,049	0,021	0,035	0,044	0,006	0,021	0,008
0,011	0,192	0,521	0,017	0,123	0,270	0,055	0,172	0,289	0,023	0,148	0,109	0,014	0,082	0,040	0,019	0,031	0,017
0,017	0,337	0,914	0,037	0,216	0,470	0,038	0,298	0,429	0,038	0,268	0,184	0,023	0,114	0,065	0,017	0,050	0,021
0,008	0,076	0,196	0,013	0,033	0,110	0,014	0,057	0,066	0,000	0,045	0,041	0,000	0,016	0,021	0,000	0,012	0,008
0,031	0,221	0,495	0,043	0,136	0,330	0,038	0,205	0,281	0,038	0,160	0,139	0,023	0,086	0,035	0,015	0,029	0,002
0,034	0,285	0,667	0,531	0,199	0,390	0,041	0,289	0,338	0,033	0,203	0,169	0,030	0,145	0,056	0,012	0,039	0,002
0,011	0,079	0,137	0,000	0,050	0,090	0,016	0,068	0,058	0,000	0,055	0,038	0,007	0,028	0,014	0,000	0,012	0,003
0,037	0,241	0,512	0,043	0,159	0,290	0,046	0,257	0,289	0,032	0,193	0,124	0,016	0,086	0,049	0,000	0,033	0,019
0,009	0,057	0,077	0,037	0,027	0,070	0,038	0,044	0,074	0,023	0,043	0,041	0,021	0,012	0,021	0,000	0,008	0,006

II - COMPOSITION DE L'EAU DE MER EN AMINO ACIDES

Dans le tableau IX nous exprimons les résultats du dosage des amino acides dans l'eau de mer : d'une part dans l'eau d'imbibition et d'autre part dans l'eau de lessivage. Ces résultats sont exprimés en µM/ml.

TABLEAU IX

COMPOSITION EN AMINO ACIDES DE L'EAU DE MER

AMINO ACIDES	EAU D'IMBIBITION µM/ml	EAU DE LESSIVAGE µM/ml
1. Cyst	Néant	Néant
2. Asp	0,001	0,002
3. Thr	Néant	Néant
4. Ser	0,002	0,002
5. Glu	Traces	0,003
6. Gly	0,003	0,004
7. Ala	Traces	Traces
8. Val	Néant	Néant
9. Cys	Néant	Néant
10. Met	Néant	Néant
11. Ile	Traces	Traces
12. Leu	Néant	Néant
13. Tyr	0,008	0,009
14. Phe	Traces	Traces
15. Lys	Traces	Traces
16. His	Traces	0,002
17. Arg	Néant	Néant
18. Orn	Néant	Néant

Le total des amino acides de chaque échantillon s'élève à 0,014 µM/ml pour l'eau d'imbibition et 0,022 µM/ml pour l'eau de lessivage. Ces résultats concordent avec les travaux de WOOD (56) sur les amino acides contenus dans l'eau de mer au terme desquels il donne une fourchette des concentrations allant de 0,002 µM/ml à 0,043 µM/ml.

III - COMPOSITION DU SEDIMENT EN AMINO ACIDES TOTAUX

- METHODE DE SATAKE :

Nous donnerons ici les amino acides totaux de chaque hydrolysat obtenu par la méthode de SATAKE et nous contrôlerons qu'ils sont bien voisins de ceux que nous pouvons tirer de la méthode chromatographique en faisant la sommation des chiffres calculés dans chaque fraction de chaque disque.

Sur les tableaux suivants nous avons rapporté les résultats donnés par la méthode de SATAKE et ceux tirés de la méthode chromatographique. Le tableau X correspond à la première carotte de sédiment. Les résultats sont exprimés comme précédemment en µMoles par gramme de sédiment.

TABLEAU X

AMINO ACIDES TOTAUX DANS CHAQUE DISQUE DE LA PREMIERE CAROTTE DE SEDIMENT, FRACTION A.

disque	Amino acides totaux Méthode de SATAKE en µM/g	Amino acides totaux Méthode CHROMATOGRAPHIQUE µM/g
1	17,081	17,480
2	40,037	41,748
3	20,012	20,404
4	20,333	21,569
5	8,147	8,503
6	9,322	9,557
7	9,055	9,204
8	14,000	14,534
9	12,072	12,082
10	8,459	8,742
11	6,289	6,419
12	5,294	5,344
13	6,817	7,221
14	2,605	2,911
15	2,987	3,000
16	2,321	2,437

Les tableaux XI, XII et XIII correspondent aux amino acides totaux des fractions B, C et D de la deuxième carotte. Ils sont exprimés en µMoles par gramme de sédiment.

TABLEAU XI

AMINO ACIDES TOTAUX DE CHAQUE DISQUE
FRACTION B en µM/g

Disques	METHODE de SATAKE en µM/g	METHODE CHROMATOGRAPHIQUE µM/g
1	0,000	0,000
2	0,279	0,600
3	0,365	0,567
4	0,483	0,546
5	0,813	0,935
6	1,128	1,944
7	1,610	2,795
8	1,476	2,080
9	1,039	1,422
10	0,725	1,407
11	0,380	0,404

TABLEAU XII

AMINO ACIDES TOTAUX DE CHAQUE DISQUE
FRACTION C en µM/g

Disques	METHODE de SATAKE en µM/g	METHODE CHROMATOGRAPHIQUE µM/g
1	2,716	2,607
2	1,333	1,776
3	2,653	2,832
4	3,040	3,103
5	4,406	4, 42
6	5,324	5,935
7	3,832	3,950
8	6,188	6,317
9	4,819	4,827
10	2,028	2,188
11	0,866	0,920

TABLEAU XIII

AMINO ACIDES TOTAUX DE CHAQUE DISQUE
FRACTION D en µM/g

Disques	METHODE de SATAKE en µM/g	METHODE CHROMATOGRAPHIQUE µM/g
1	16,758	17,373
2	6,306	6,665
3	11,153	11,589
4	9,672	9,696
5	9,745	10,562
6	11,196	11,839
7	5,700	5,760
8	1,445	1,422
9	2,560	2,539
10	1,007	1,463
11	0,274	0,273

L'étude de ces tableaux nous montre que les résultats entre les deux méthodes sont tout à fait comparables pour les fractions A C et D. Seule la fraction B diffère notablement, les chiffres par la méthode de SATAKE sont souvent inférieurs à ceux de la méthode chormatographique. Cela est dû aux erreurs qui peuvent s'accumuler en raison de la faible concentration des amino acides : l'interprétation du pic chromatographique fait quelques fois l'objet d'une erreur par excès ; en effet le calcul de la surface du pic comme nous l'avons vu page 58 se fait à partir du produit de la hauteur du pic en densité optique lue directement sur le papier semi-logarithmique, par la largeur du pic mesurée à mi-hauteur sur ce même papier ; nous comprendrons ainsi que plus la densité optique est faible, plus l'imprécision est grande entraînant une certaine marge d'erreurs.

IV - DISCUSSION

Bien que les prélèvements aient été effectués aux mêmes endroits, la composition globale des disques est différente. La variation est surtout sensible au

niveau des fractions proches de la surface. Il est très possible que certains fragments de coquillages ou de vers aient traversé le tamis et provoqué une augmentation accidentelle des amino acides du disque correspondant.

1°) - Amino acides totaux :

Si nous considérons l'évolution des amino acides totaux au sein de la carotte, nous constatons une diminution en fonction de la profondeur.

Nous avons représenté sur la figure suivante (figure n° 17) l'évolution de la concentration en amino acides exprimée en µMoles par gramme et déterminée par la méthode de SATAKE en fonction de la profondeur.

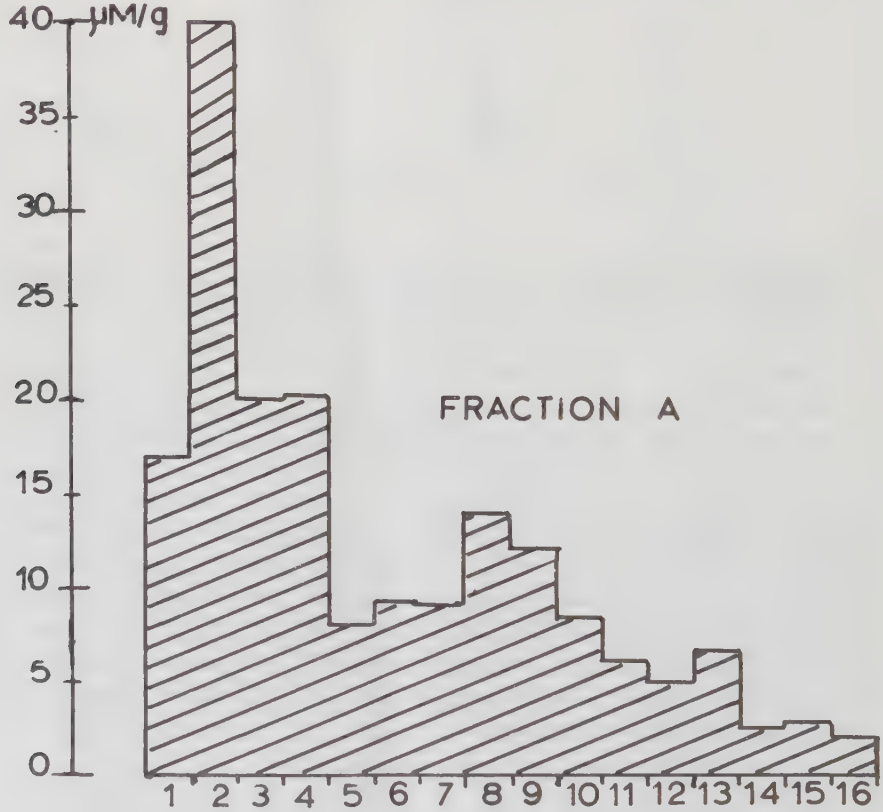


Figure n° 17 : Evolution du taux des amino acides en fonction de la profondeur.

La forme de la courbe obtenue n'est pas régulière, au contraire nous observons des variations souvent considérables.

Nous pouvons attribuer cela à la superposition de plusieurs phénomènes. D'une part il faut remarquer que la teneur en sable, augmentant de la surface à l'extrémité de la carotte, est inversement proportionnelle à la teneur en amino acides. Tout se passe comme si le sable n'avait pas la propriété de fixer les amino acides. D'autre part nous pouvons estimer à 0,5 cm la hauteur de sédiment qui se dépose par an. Nous pouvons en déduire que la partie la plus profonde de la carotte est plus ancienne d'un siècle par rapport à la surface. Nous pouvons alors expliquer que les évolutions en dents de scie sont dues à des modifications de la concentration du sédiment en fonction des époques et que la diminution semble être consécutive à une disparition des amino acides en tant que tels. Ils ont pu être transformés en substances non azotées et de ce fait non détectables par les techniques précédentes.

De plus la concentration plus importante en surface est en relation directe avec un métabolisme interne dû à la faune présente, il n'est pas exclu qu'une biosynthèse abondante d'amino acides y soit présente.

Nous avons tracé l'histogramme correspondant aux quantités d'amino acides présents dans chaque disque sous trois formes :

- B - Amino acides libres
- C - Polypeptides solubles
- D - Polypeptides insolubles.

Dans ce but nous avons porté en ordonnée les concentrations d'amino acides exprimés en µMoles par gramme de sédiment et en abscisse le numéro du disque. Cet histogramme est reproduit sur la figure n° 18 page 71.

L'observation de l'histogramme des différentes fractions nous montre que la fraction B (amino acides libres), est la plus faiblement représentée. La fraction C (polypeptides solubles) vient en seconde position. La fraction D (polypeptides insolubles), est la plus abondante. La répartition en pourcentage est la suivante :

- Fraction B 7,5 %
- Fraction C 31,5 %
- Fraction D 61,0 %

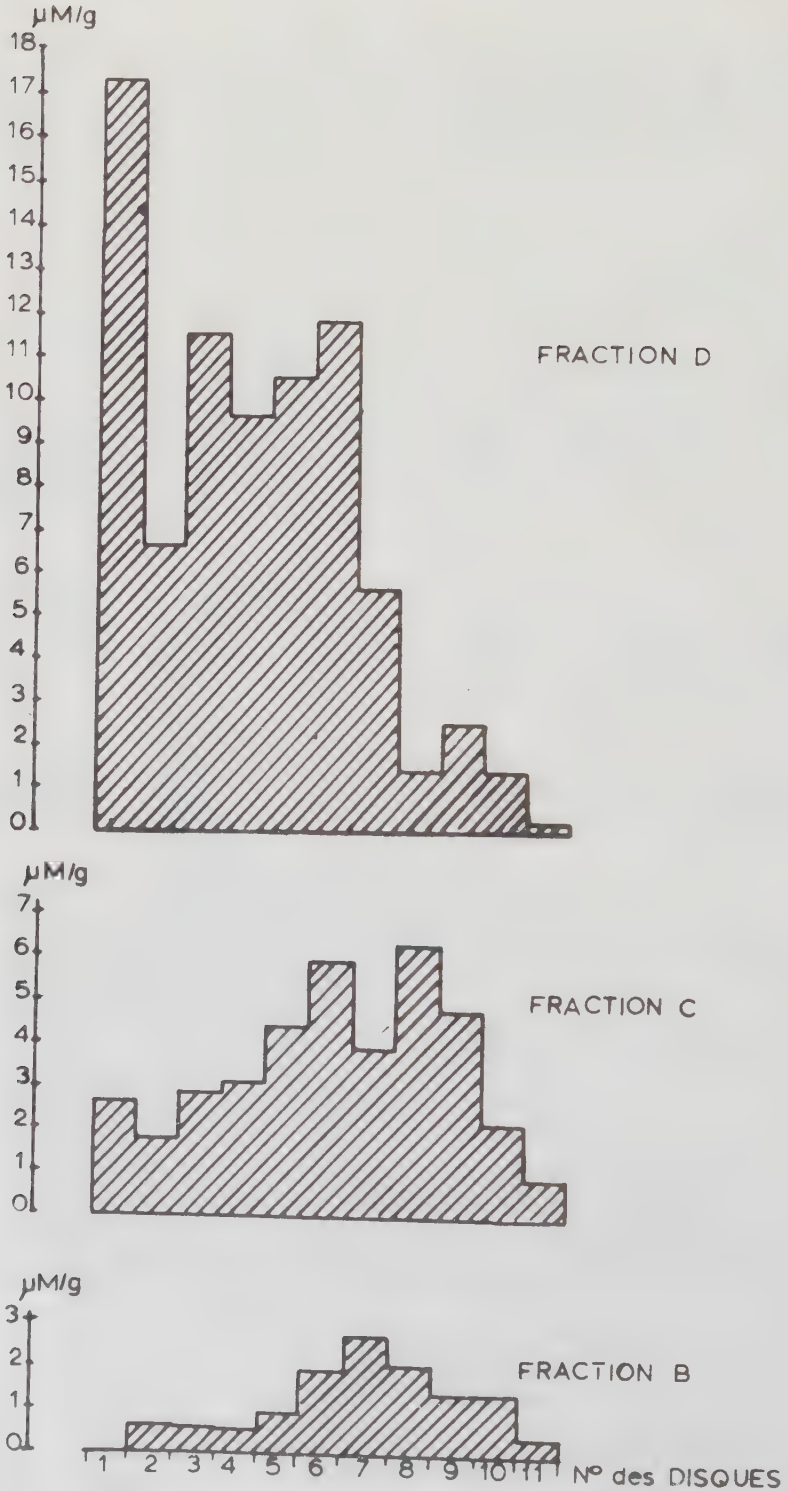


Figure n° 18 : Histogramme des différentes fractions.

2°) - *Composition en amino acides de chaque disque :*

L'examen du tableau de résultats que nous avons présenté pages 64 et 65 est très difficile à interpréter car des variations inhérentes aux prises d'essais ainsi que des erreurs dans la mesure des surfaces (la méthode chromatographique conduisant à une précision voisine de 10 %) donnent des chiffres peu faciles à comparer d'un disque à l'autre.

Aussi dans le but de rendre les résultats plus comparables, nous avons recherché un nombre qui multiplié par chacune des concentrations nous donne un nombre entier : nous avons choisi l'amino acide le moins concentré (souvent l'ornithine), et nous lui avons attribué la valeur 1, de ce fait le multiplicateur a pour valeur l'inverse de la concentration de l'amino acide.

Par exemple dans la colonne C1 la plus petite valeur est 0,0244 et représente la quantité d'ornithine, le multiplicateur prend alors pour valeur l'inverse de ce nombre, soit 40,9836.

Nous avons multiplié chaque concentration de la colonne C1 par ce nombre. Nous avons choisi la valeur entière la plus proche. Par exemple pour l'acide aspartique nous avons :

0,2623 x 40,9836 = 10,83 peu différent de 11

Comme le total des amino acides ainsi calculé mais non arrondi était proche de 100, nous avons calculé directement en pourcentage les chiffres obtenus.

Ce sont ces résultats que nous avons reproduits sur le tableau XIV.

TABLEAU XIV

POURCENTAGES DE CHAQUE AMINO ACIDE DANS LES DISQUES
DES FRACTIONS C ET D

	FRACTION C											FRACTION D									
Disques	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11
1 Asp	10	10	10	12	15	12	11	13	15	10	10	9	11	10	13	13	11	13	11	11	10	11
2 Thr	1	6	6	6	6	6	6	5	5	6	6	5	5	5	4	4	4	4	4	5	6	5
3 Ser	10	7	6	7	7	7	8	6	6	7	7	6	6	6	6	5	6	8	5	8	7	6
4 Glu	14	9	9	9	10	9	13	11	12	11	11	9	7	8	10	11	9	10	8	9	9	8
5 Gly	25	26	26	25	21	23	22	23	20	17	20	19	21	19	17	15	17	13	17	13	27	12
6 Ala	6	9	7	7	7	9	9	8	8	7	6	9	8	10	10	8	10	7	8	6	9	6
7 Val	3	4	5	6	5	6	7	6	6	9	4	7	7	7	7	10	7	8	8	8	4	3
8 Cys	3	4	4	3	4	2	3	3	3	3	3	2	3	2	2	2	2	2	4	4	4	5
9 Met	7	3	3	2	3	2	2	3	2	2	3	3	4	2	1	5	2	4	2	2	3	3
10 Ile	2	2	3	2	3	3	4	3	3	4	3	4	4	4	5	4	4	7	5	4	3	5
11 Leu	4	4	5	5	6	5	6	5	6	5	5	8	7	7	8	7	8	8	8	7	4	6
12 Tyr	2	2	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	2	2	2	2	2	1	2	1	4
13 Phe	2	2	4	3	4	4	4	3	3	4	3	4	4	4	5	5	4	6	5	5	2	5
14 Lys	5	4	5	4	4	5	6	5	4	7	4	6	6	6	6	6	6	7	6	7	4	5
15 His	3	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	2	1	1	1	1	2	1	1	1	5
16 Arg	4	3	4	4	4	3	5	4	4	4	4	5	4	4	5	4	4	5	5	5	3	6
17 Orn	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1	1

De ces différents chiffres nous pouvons remarquer certaines coïncidences concernant la fraction polypeptidique C ; ce polypeptide aurait la composition suivante en nombres de Moles pour cent :

Ala :	8	Glu :	10	Leu :	6	Phe :	4	Tyr :	2
Arg :	4	Gly :	20	Lys :	5	Ser :	7	Val :	6
Asp :	10	His :	2	Meh :	3	Thr :	5	Orn :	1
Cys :	3	Ile :	4						

Avec ces résultats nous avons reproduit l'histogramme suivant (figure n° 19) :

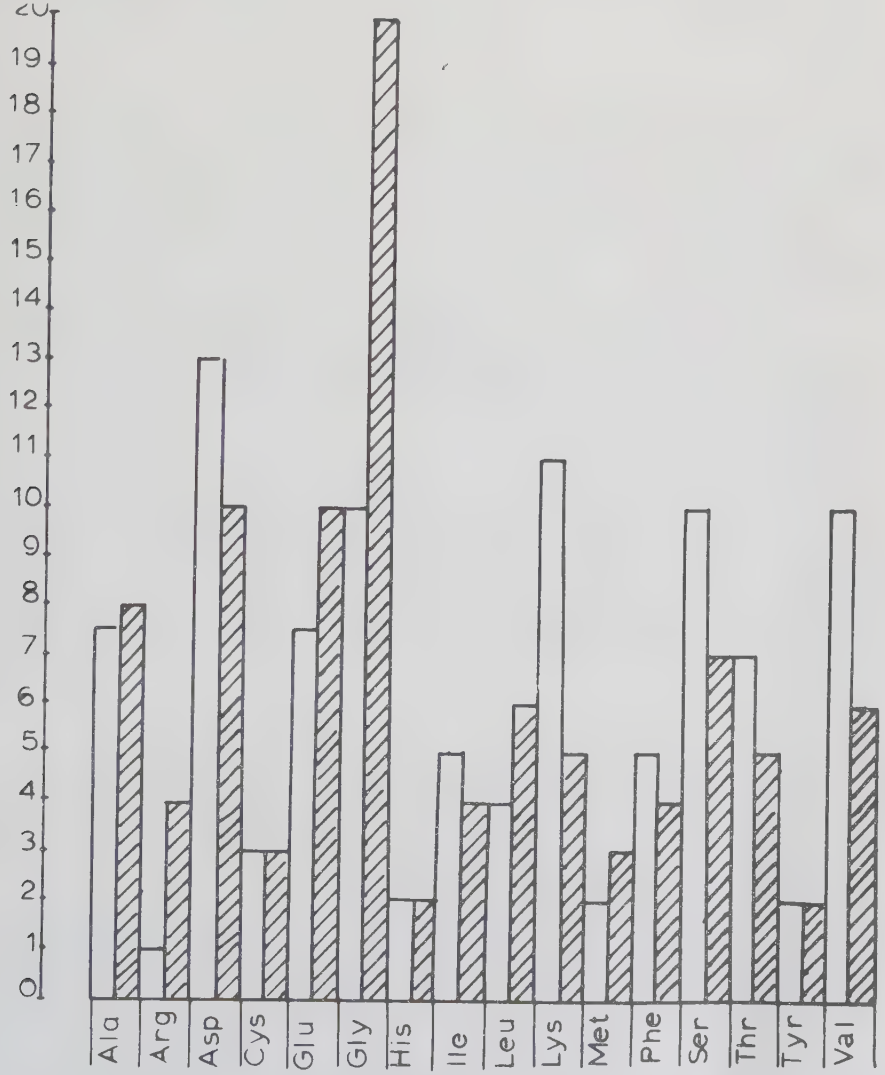


Figure n° 19 : Histogramme du polypeptide (hachurée) et de l'azurin d'Alcaligènes Fécalis (blanc).

Nous avons recherché dans l'atlas des séquences protéidiques (3) quelle protéine connue pouvait être proche du polypeptide correspondant à la fraction C.

Dans ce but nous avons converti les valeurs du nombre de molécules d'amino acides de chaque protéine ou polypeptide de cet atlas en pourcentage et nous avons construit les histogrammes correspondants. Puis nous avons dessiné l'histogramme de la figure n° 19 sur du papier calque à la même échelle et placé ce calque sur les histogrammes issus de l'atlas. De ce fait les recherches d'identité ou d'analogie avec les protéines étudiées ont été très simplifiées.

En fait aucun histogramme de l'atlas ne s'est avéré identique au polypeptide. Cependant, certaines similitudes pourraient être relevées avec la protéine dite : Azurin de l'Alcaligènes Fécalis. Nous avons superposé sur la figure n° 19 les deux histogrammes correspondants au polypeptide et à l'Azurin d'Alcaligènes Fécalis. Nous remarquons que les amino acides suivants sont en plus fortes proportions : Ala, Arg, Cys, Glu, Gly, Leu, Phe.

Cette analogie n'est pas démunie d'intérêt et nous laisse penser que le polypeptide de la fraction C pourrait être biosynthétisé par un germe à partir des amino acides présents.

L'examen des chiffres de la fraction D ne révèle aucune analogie, ce qui semble indiquer que la propriété particulière de solubilité n'est pas un critère de pureté absolue. De ce fait, nous sommes en présence de plusieurs mélanges différents selon le disque auquel nous avons à faire.

3°) - *Origine des amino acides :*

La teneur en substances azotées ninhydrine positives des vases du bassin d'ARCACHON est remarquable à tous points de vue. Cependant, nous devons étudier les raisons de cette abondance et son origine.

Si nous examinons la structure physico-chimique de ce sédiment, nous observons que ce dernier est un remarquable échangeur de cations. Cette propriété est connue depuis fort longtemps, les sédiments argileux ayant joué le rôle d'adoucisseurs d'eau ou d'agents de nettoyage (terre à foulon), il n'est pas étonnant d'y trouver des amino acides fixés sur ces derniers.

Si nous recherchons l'origine des amino acides il ne fait aucun doute que l'eau de mer par le jeu du flux et du reflux joue un rôle prépondérant. En effet, il existe une différence entre la teneur en amino acides de l'eau d'imbibition et de l'eau de lessivage (voir page 66) et qui se situe au alentours de 8 µMoles par litre, ce qui représente des quantités considérables au contact du sédiment lors de chaque marée. L'eau d'imbibition restant très longtemps au contact des grains de sédiment, a échangé efficacemment ses amino acides et de ce fait s'est appauvrie par rapport à l'eau de lessivage.

Mais si une partie des amino acides provient de la mer, source pratiquement innépuisable, une autre partie non négligente, pourrait avoir pour origine les effluents des villes situés aux pourtours du bassin. Que ces effluents soient épurés° ou non, cette hypothèse est à rapprocher de la forte teneur des disques en ions sulfure.

L'origine des polypeptides solubles ou non est plus discutable en raison de l'homogénéité du polypeptide présent dans toutes les couches, il semblerait qu'elle soit plus probablement bactérienne. De toute manière l'hypothèse de la transformation des amino acides en polypeptide est à retenir car la fixation d'un polypeptide nécessite moins de points de fixation que les amino acides libres en quantités équivalentes.

Ceci explique alors que les amino acides libres ne représentent que 7,5 % du total des amino acides. En conséquence la capacité d'échange des couches superficielles toujours remises en suspension par le flux et le reflux, reste élevée.

Enfin, il ne serait guère étonnant que la vie marine ne bénéficie pas au maximum de ce concentré azoté et nous pensons que les huitres arcachonnaises voient leur développement conditionné par les vases du bassin.

Ainsi la composition des vases du bassin d'ARCACHON semble bien être liée au problème de la capacité de fixation des amino acides sur le support minéral que constitue les argiles, problème que nous allons étudier dans le troisième chapitre.

° *Epuration consistant la plupart du temps à liquéfier les différentes matières laissant à la nature le soin d'oxyder les petites molécules (amino acides, glucides etc...).*

V - CONCLUSIONS

Dans ce chapitre nous avons dans une première partie exprimé les résultats relatifs aux quantités d'amino acides présents dans les sédiments du bassin d'ARCACHON, résultats obtenus par la méthode chromatographique.

Dans une deuxième partie nous avons exposé les quantités d'amino acides présents d'une part dans l'eau d'imbibition et d'autre part dans l'eau de lessivage. Ces résultats ayant été obtenus de même que précédemment par la méthode chromatographique.

Une troisième partie a été consacrée aux résultats obtenus par la méthode de SATAKE et concernant les amino acides totaux contenus dans les sédiments récents du bassin.

Une discussion nous a permis d'étudier l'évolution des amino acides totaux au sein du sédiment. Nous avons ensuite donné une interprétation à la composition en amino acides de chaque disque et ceci en transformant les chiffres obtenus par la méthode chromatographique, en pourcentage, nous avons retenu la possibilité de la présence d'un polypeptide. Enfin nous avons discuté de l'origine des amino acides et émis des hypothèses sur leur mode de fixation et les conséquences de leur présence sur l'écologie locale.

C H A P I T R E III

CAPACITE DE FIXATION DES AMINO ACIDES PAR UNE ARGILE

Les résultats obtenus dans l'étude précédente nous ont montré que des sédiments silico-argileux d'origine marine étaient capables de fixer une quantité importante d'amino acides libres ou peptides.

Nous avons émis l'hypothèse que cette fixation était en relation avec un phénomène d'échange d'ions au niveau de l'argile constituant le sédiment. Aussi dans le but de préciser ce phénomène, nous avons recherché les conditions optimales de fixation des amino acides sur un support argileux.

Le sédiment marin déjà étudié étant assez chargé en matières azotées, nous avons recherché un sédiment de même nature mais plus pauvre en amino acides.

Après quelques essais nous avons choisi un sédiment d'origine fluviale mais non submergé, excepté en période d'inondation printanière.

I - INTRODUCTION

1°) - Lieu et technique de prélèvement de l'échantillon :

Le sédiment a été prélevé en automne sur les berges de la Dordogne, en aval de CASTILLON LA BATAILLE, au lieu dit MANEGAT, commune de SAINT MAGNE DE CASTILLON en Gironde. Le site se trouve au niveau des eaux de la Dordogne et n'est recouvert qu'en période de crues. Il s'agit d'alluvions récentes. Les prélèvements ont été réalisés en surface, sans précautions particulières.

2°) - Traitement de l'échantillon :

Les débris végétaux, se trouvant encore dans le sédiment, après triage à la main, ont été séparés par tamisage sur une gaze sans dessication exagérée.

Sur une partie aliquote de ce sédiment, nous avons recherché la quantité d'amino acides qui pouvaient s'y trouver après une extraction en milieu acide chlorhydrique. De plus ce traitement avait pour but d'obtenir par sédimentation en milieu acide des particules de dimensions et de poids aussi homogènes que possible.

Environ 100 grammes de sédiment ont été additionnés de 100 ml d'acide chlorhydrique 6 N et laissés en contact pendant environ 24 heures après une agitation modérée.

Après séparation de la phase surnageante chlorhydrique, le sédiment a été lavé plusieurs fois (4 fois au moins) par de l'eau distillée jusqu'à ce que les eaux résiduaires ne présentent plus de caractère acide.

Ces opérations de lavage sont de longue durée car la sédimentation s'effectue naturellement. Les eaux surnageantes ont été retirées par aspiration et de ce fait les particules les plus fines non sédimentées ont été éliminées avec les eaux de lavage.

Le sédiment ainsi lavé a été séché à 37°. Après dessication complète, nous l'avons désagrégé au mortier et tamisé.

3°) - Classement granulométrique :

Nous avons voulu examiner l'homogénéité granulométrique du sédiment ainsi obtenu. Dans ce but, nous avons placé 5 g de sédiment traité dans un tube à centrifuger contenant 5 ml d'eau distillé. Après homogénéisation par renversement et agitation modérée et centrifugation de 5 minutes à 3 000 tours/minute, le tube présentait 4 couches distinctes, (figure n° 20).

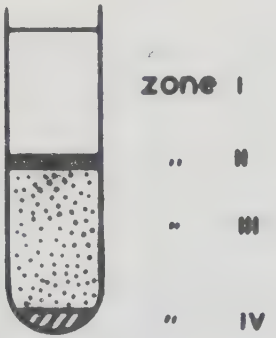


Figure n° 20 : Schéma des 4 couches obtenues après centrifugation du mélange sédiment-eau. (Légende voir texte).

De haut en bas nous trouvons :

Zone I : elle correspond à une première couche isotrope constituée par l'eau.

Zone II : cette deuxième couche de couleur marron clair, de très faible épaisseur, facilement remise en suspension, est constituée de particules très légères d'aspect colloïdal.

Zone III : cette troisième couche de couleur marron foncé, est la plus importante ; elle correspond à la fraction silico-argileuse du sédiment.

Zone IV : cette quatrième couche située au fond du tube, est peu volumineuse, de couleur plus claire et d'un aspect plus granuleux que les précédentes constitue la partie sableuse du sédiment.

Etant donné que les deux fractions les plus hétérogènes se trouvaient en très faible quantité, nous n'avons pas jugé nécessaire de les séparer du sédiment ; tous les essais qui suivent ont donc été faits sur le sédiment dans son entier, c'est-à-dire correspondant au mélange des trois couches. Par ailleurs il nous semblait préférable de garder les particules sableuses avec le mélange, car de cette façon nous nous rapprochions des conditions naturelles, ces particules sableuses évitant en outre le colmatage du sédiment au cours de nos expériences de fixation d'amino acides.

4°) - *Analyse des amino acides fixés sur l'échantillon :*

Nous avons voulu déterminer la quantité d'amino acides restant sur le sédiment après traitement en milieu acide nécessaire pour la préparation du matériau utilisé.

Une partie aliquote du sédiment après traitement à l'acide chlorhydrique, a été placée dans un ballon avec une nouvelle fraction d'acide chlorhydrique 6 N. Le contenu du ballon a été hydrolysé à ébullition 24 heures, sous réfrigérant à reflux.

Les conditions expérimentales ont été les suivantes : une prise d'essai de 50 g environ de sédiment traité ont été placés dans un ballon contenant 50 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Après 24 heures d'hydrolyse à ébullition et refroidissement, le milieu a été décanté. Le surnageant évaporé à sec a été repris par 50 ml d'eau bidistillée.

Sur cette solution nous avons effectué un dosage chromatographique sur résine échangeuse d'ions suivant la méthode décrite page 46.

Les résultats obtenus sont reportés sur le tableau suivant (n° XV) et sont exprimés en micromoles par grammes.

TABLEAU XV

COMPOSITION EN AMINO ACIDES DU SEDIMENT D'ORIGINE FLUVIALE

AMINO ACIDES	µMoles/g
Acide cystéique	Néant
Acide aspartique	2,2770
Thréonine	3,0797
Sérine	1,5501
Acide glutamique	2,5656
Glycocolle	5,0136
Alanine	3,3353
Valine	2,4587
Cystine	1,0262
Méthionine	0,9407
Isoleucine	0,8338
Leucine	1,3683
Tyrosine	0,0641
Phényl alanine	0,4276
Lysine	1,0690
Histidine	0,2245
Arginine	0,2245
Ornithine	0,0428

Nous avons fait la somme des amino acides recueillis et nous avons contrôlé que les quantités obtenues coïncidaient bien, aux erreurs d'expériences près, aux résultats obtenus par la méthode au T.N.B.S. déjà décrite page 44.

Résultats par la méthode de SATAKE 23,794 µM/g
Résultats par la méthode chromatographique 24,737 µM/g

Lors du traitement de l'échantillon une caractérisation à la ninhydrine nous a montré qu'il n'y avait pas d'amino acides libres entrainés par l'acide chlorhydrique.

Nous remarquons qu'il y a relativement peu d'hydrogène sulfuré dégagé lors du traitement à l'acide chlorhydrique, de ce sédiment d'origine fluviale ; cela est dû au fait que le sédiment n'est pas souillé de sulfures comme dans le cas du bassin d'ARCACHON et que sa relative siccité a pratiquement arrêté la fermentation.

La teneur en amino acides totaux est relativement faible: 5 g/kg de sédiment sec, mais cependant du même ordre de grandeur que celle que nous avons obtenue pour les couches proches de la surface du sédiment marin (pages 64 et 65) tous les amino acides sont ici présents avec les mêmes prédominances que celles observées dans le sédiment du bassin d'ARCACHON.

II - FIXATION DES AMINO ACIDES

Si nous examinons les conditions naturelles de fixation des amino acides sur un support argileux, nous remarquons que le sédiment se trouve pendant un certain temps avec la solution aqueuse d'amino acides, puis que celle-ci se trouve être éliminée et remplacée par une autre. Aussi nous avons essayé de nous placer dans les mêmes conditions. Dans ce but deux séries de travaux ont été mises en oeuvre.

Tout d'abord nous avons constitué avec le sédiment une colonne similaire à une colonne chromatographique. La solution chargée d'amino acides passe dans la colonne, et est ultérieurement analysée par la méthode classique.

Parallèlement nous avons imaginé une méthode beaucoup plus proche de la réalité qui consiste à placer un certain poids de sédiment au contact d'une solution d'amino acides. Après agitation, le sédiment et la solution sont séparés puis la solution est analysée.
Nous allons étudier ces deux méthodes.

1°) - Méthode utilisant des colonnes :

Dans une première série de travaux nous avons utilisé le système de la percolation dans des colonnes en verre.

- Le principe en est le suivant :

Nous utilisons des colonnes en verre pour usage chromatographique. L'extrémité inférieure est bouchée soit avec un verre fritté, soit avec un tampon de laine de verre ou encore un filtre Millipore°.

° *MILLIPORE : 46 rue LOUIS BLERIOT 78530 BUC.*

- La colonne elle même est conditionnée comme suit : une émulsion à partie égale d'eau et de sédiment est préparée dans un bécher et versée directement dans la colonne. La sédimentation et l'élimination de l'eau se font simultanément ; au fur et à mesure de la baisse du niveau, un complément d'émulsion est ajouté.

Cette méthode classique s'est révélée très rapidement inutilisable, la colonne se colmatant assez vite et avant même que toute l'eau de l'émulsion soit écoulée. De plus, l'augmentation de la pression au-dessus de la colonne, ou la dépression au dessous ne fait qu'aggraver le phénomène.

Plusieurs essais ont été faits avec des colonnes de dimensions variables et plus ou moins de succès ; c'est ainsi par exemple qu'une colonne de 9 cm de hauteur sur 1 cm de base, à bouchon de laine de verre et comprenant 10 g de sédiment, permet le passage de 5 ml de solution d'amino acides en 15 heures environ. Ce délai beaucoup trop long nous a conduits à utiliser des seringues en plastique d'une capacité de 5 ml, obstruées à leur base par un tampon de laine de verre. Un cathéter en polyéthylène est fixé sur l'embout de la seringue en vue de recueillir les fractions. Le garnissage est réalisé de la manière habituelle avec 6 ml d'une émulsion à 50 % d'eau. L'élimination de l'eau se fait sans trop de difficulté. L'expérience consistant à percoler le sédiment par une solution d'amino acides est facilitée par le fait qu'il suffit de placer le volume de solution au-dessus du sédiment et à remettre le piston dans le corps de la seringue. La pression relativement douce exercée sur le piston permet un passage rapide de la solution.

2°) - *Procédé par contact* :

Dans une deuxième série de travaux, nous avons utilisé la méthode suivante : nous avons placé dans un tube à centrifuger 1 g de sédiment et nous avons ajouté un volume connu d'une solution d'amino acides à étudier. Après agitation et un temps de contact variable, le tube est centrifugé à grande vitesse. Le liquide surnageant est décanté et analysé. C'est une méthode très rapide et qui permet de nombreuses expériences simultanées.

Des deux méthodes présentées, la seconde est la plus opérationnelle, cependant les résultats ne sont pas tout à fait comparables. C'est ainsi que dans la seconde

méthode le sédiment est entièrement en contact avec la solution, nous avons donc un seul équilibre. Tandis que dans la méthode par percolation, à chaque couche correspond un équilibre particulier, car chaque fraction située en dessous de la précédente, se trouve en présence d'une solution de plus en plus appauvrie ; nous avons donc de multiples zones d'équilibre. L'efficacité de la colonne est beaucoup plus grande que celle du tube à centrifuger.

3°) - *Forme du sédiment utilisé* :

Nous avons essayé de modifier la forme physique du sédiment afin d'améliorer le remplissage de la colonne ou de faciliter la manipulation dans le cas du tube à centrifuger. En effet, l'emploi d'une suspension à 50 % de sédiment dans l'eau distillée, entraîne l'élimination de l'eau support. Dans le cas de la centrifugation, cette élimination s'accompagne du départ de très fines particules. L'emploi direct du sédiment sec en poudre s'est avéré plus intéressant par la simplification des opérations, mais n'a pas modifié les résultats.

4°) - *Protocole opératoire* :

a - Solutions d'amino acides utilisées :

- Solution standard d'amino acides à 45 µM/ml ; cette solution correspond au standard d'amino acides utilisé dans la chromatographie sur colonne.

- Solution à 1 000 µM/ml de chacun des amino acides suivants : Acide Aspartique, Thréonine, Sérine, Acide Glutamique, GLycocolle, Alanine, Valine, Cystine, Méthionine, Isoleucine, Leucine, Tyrosine, Phénylalanine, Lysine, Histidine, Arginine.

- Solution contenant au total 1 000 µM/ml d'amino acides. Cette solution est obtenue en prélevant 10 ml de chacune des solutions précédentes. Les 160 ml obtenus contiennent au total 16 000 µMoles soit 1 000 µM/ml. Chaque amino acide a une molarité égale à : 1 000 : 16 = 62,5 micromoles par millilitre.

b - Techniques analytiques :

Nous avons utilisé deux méthodes : la méthode chromatographique et la méthode de SATAKE déja décrites. Cependant, pour améliorer la vitesse de lecture nous avons utilisé l'adaptation de la méthode de SATAKE à l'analyse automatique selon la méthode de PALMER et PETERS (41). Cette méthode permet une cadence de dosage de 40 échantillons à l'heure. Nous avons modifié le manifold original en tenant compte du fait qu'il était inutile d'effectuer une dialyse.

Nous avons représenté sur la figure n° 21 le manifold après modification.

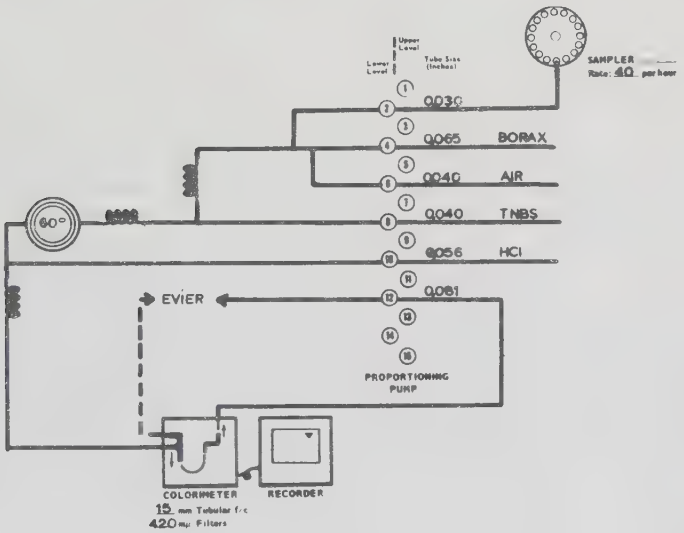


Figure n° 21 : Manifold modifié de la méthode de PALMER et PETERS.

- Désignation des tubes de pompe :

1 - Echantillon	(CPV)	noir noir,	0,32 ml/mn
2 - Air	(CPV)	blanc blanc,	0,60 ml/mn
3 - Tampon Borax	(CPV)	bleu bleu,	1,60 ml/mn
4 - Réactif TNBS	(CPV)	blanc blanc,	0,60 ml/mn
5 - Acide chlorhydrique	(CPV)	jaune jaune,	1,20 ml/mn
6 - Repompage	(CPV)	violet violet,	2,50 ml/mn

Le bain marie est à 60° C.

La longueur d'onde du photomètre est 420 mμ.

- Réactifs :

Solution d'acide -2,4,6- trinitrobenzène sulfonique à 0,034 %
T.N.B.S. ..... 0,3 g
H_2O distillée .....QSP 1000 ml
Réactif à garder au froid et à l'obscurité.

Solution tampon de Borax (tétraborate de sodium) 0,05 M
Tétraborate de sodium ..... 19,072 g
Solution de Brij° ..... 10 ml
Eau distillée .....QSP 1000 ml

Acide chlorhydrique 0,1 N.

- Technique :

Pour chaque série de dosage, nous effectuons une gamme d'étalonnage avec une solution standard d'amino acides à 45 μM/ml (représentant 2,5 μM/ml de chacun des amino acides présents).

Comme dans le cas de la technique manuelle, nous avons choisi ce type de gamme étalon car il nous a semblé le plus représentatif d'un échantillon inconnu à doser, ce dernier pouvant contenir un éventail de tous les amino acides. Quatre étalons sont préparés selon les indications du tableau suivant (tableau XVI).

TABLEAU XVI

GAMME ETALON DE LA METHODE AU T.N.B.S. APPLIQUEE A L'ANALYSE AUTOMATIQUE

ETALON	1	2	3	4
Solution d'amino acides à 45 μM/ml dilué au 1/100	0,1	0,2	0,2	0,8
H_2O	0,9	0,8	0,6	0,2

° *BRIJ voir page 52.*

Afin de faciliter la lecture il est préférable de réaliser l'enregistrement des pics sur papier semi-logarithmique et de lire directement la hauteur du pic en densité optique. Le report de ces valeurs sur du papier millimétré conduit à une droite. L'analyse elle-même ne pose pas de difficulté particulière, si ce n'est de rincer abondamment le circuit à l'aide d'une solution diluée de Brij.

5°) *Résultats*

1) Recherche de la saturation d'une argile par un mélange d'amino acides (percolation).

Dans cette série d'expériences, nous avons cherché à obtenir la saturation totale du sédiment par une solution contenant un mélange de différents amino acides à une concentration totale de 1 000 µM/ml. Nous avons fait appel, ici, à la méthode par percolation décrite page 84. Nous avons confectionné une colonne de sédiment à l'aide d'une seringue plastique de 5 ml dans laquelle nous avons introduit 3 grammes de sédiment. Pour saturer cette colonne de sédiment nous l'avons surchagée en amino acides jusqu'à ce que la solution éluée soit à la concentration initiale.

Le protocole expérimental est le suivant : le sédiment est recouvert au sommet de la colonne, par trois millilitres de solution d'amino acides. A l'aide du piston de la seringue, nous faisons pénétrer totalement cette solution à travers le sédiment. L'éluat est récupéré dans une éprouvette graduée de 5 ml placée en sortie de colonne, nous permettant ainsi de le contrôler.

Nous avons répété cette opération à quatre reprises. L'éluat obtenu à chaque passage est analysé par la méthode de SATAKE (voir page 44). Par différence entre la concentration de départ et la concentration de l'éluat, nous avons déduit la quantité d'amino acides fixés par gramme de sédiment.

Sur les tableaux XVII et XVIII, nous rapportons les résultats relatifs aux essais de saturation effectués d'une part sur une colonne de sédiment sec et tassé, et d'autre part sur une colonne de sédiment humide après sédimentation. Nous avons calculé le pourcentage R d'amino acides fixés par rapport à la quantité d'amino acides mis en contact.

Dans les tableaux XVII et XVIII les résultats sont exprimés en µMoles d'amino acides mis en contact, élués ou fixés.

TABLEAU XVII

RESULTATS RELATIFS AUX ESSAIS DE SATURATION SUR SEDIMENT SEC

Ordre d'élution	Amino acides en contact en µM	Eluat en µM	Amino acides fixés en µM	R en %
1	1 000	657	343	34,3
2	1 000	729	271	27,1
3	1 000	854	146	14,6
4	1 000	1 000	0	0
TOTAL	4 000	3 240	760	

TABLEAU XVIII

RESULTATS RELATIFS AUX ESSAIS DE SATURATION SUR SEDIMENT HUMIDE

Ordre d'élution	Amino acides en contact en µM	Eluat en µM	Amino acides fixés en µM	R en %
1	1 000	630	370	37,0
2	1 000	755	245	24,5
3	1 000	840	160	16,0
4	1 000	1 000	0	0
TOTAL	4 000	2 225	775	

Aux erreurs d'expériences près, nous retrouvons des résultats semblables pour un sédiment sec et pour un sédiment humide, le sédiment à l'état humide présentant l'avantage d'être d'un emploi plus facile pour le remplissage de la colonne.

Dans l'analyse des amino acides contenus dans ce sédiment sous forme peptidique (voir page 83), nous avons obtenu 25 µM par gramme. Si nous ajoutons cette quantité initiale à la quantité que nous venons de préciser dans le cadre de nos essais de saturation, nous obtenons un total de 800 µM/g.

Si nous prenons comme poids moléculaire moyen d'un amino acide d'un mélange, la valeur de 170, nous pouvons calculer la quantité fixée à saturation en gramme par gramme de sédiment :

$$800.10^{-6} \times 170 = 0,136 \text{ g/g}$$

soit 13,6 %

Ce résultat est très élevé, le chiffre obtenu dépend des conditions expérimentales et de la nature du sédiment (voir page 81), ce dernier pouvant être en particulier plus ou moins riche en sable, ce qui influe sur le nombre de sites de fixation.

2) Etude de l'élution en fonction du pH :

Après avoir étudié les modalités de fixation des amino acides sur un sédiment silico argileux, nous avons essayé de déplacer ces amino acides à l'aide de tampon citrate à différents pH à la manière des colonnes échangeuses d'ions.

Nous avons tout d'abord saturé une colonne de sédiment à l'aide d'une solution d'amino acides. La saturation atteinte, les amino acides ont été élués à l'aide de tampons citrate à pH 2,75, pH 5 et pH 10 (voir p. 52-53) ces mêmes tampons servant pour la séparation des amino acides par la méthode chromatographique sur colonne de résine échangeuse d'ions. L'éluat récupéré après le passage de chaque tampon, a été analysé par la méthode chromatographique (voir page 46).

Mode opératoire :

α - La saturation du sédiment :

Nous avons confectionné une colonne de sédiment à l'aide d'une seringue de 5 ml. Dans un premier temps, nous avons saturé cette colonne dans les mêmes conditions que précédemment (voir page 89), en injectant successivement quatre volumes égaux de 3 ml chacun, d'une solution contenant des amino acides à la concentration de 1 000 µM/ml au total. Nous nous sommes assurés de la saturation du sédiment par l'analyse de l'éluat correspondant à la dernière injection ; nous avons récupéré la totalité des amino acides soit 1 000 µM/ml. Les quantités d'amino acides ont été calculées par différence entre les quantités d'amino acides mis en contact et les quantités d'amino acides élués. Nous avons trouvé 735 µM fixées, chiffre qui correspond aux précédents (voir page 90) aux erreurs d'expériences près.

β - L'élution des amino acides :

Dans un deuxième temps nous avons procédé à l'élution des amino acides fixés sur le sédiment à l'aide de tampons à différents pH.

Nous avons d'abord fait appel au tampon citrate à pH 2,75. De même, nous avons élué par du tampon citrate à pH 5, et enfin par du tampon à pH 10. Chaque éluat a été analysé séparément par la méthode chromatographique (voir page 46), après avoir été convenablement dilué à l'aide d'eau bidistillée et acidifiée, de façon à être à un pH voisin de 2.

Résultats :

Sur le tableau suivant (Tableau XIX), nous avons transcrit les résultats calculés pour chaque amino acide à partir des diagrammes obtenus par la méthode chromatographique (méthode de calcul décrite page 57). Les trois premières colonnes de ce tableau correspondent aux différentes élutions par les tampons citrate à pH 2,75 - 5 et 10. Dans une quatrième colonne, nous avons fait figurer, pour chacun des amino acides du mélange, le total de µMoles fixées par gramme de sédiment. En outre, nous avons totalisé le nombre de µMoles fixées, total peu différent de celui obtenu par la méthode de SATAKE (47).

Tous ces résultats sont exprimés en µMoles d'amino acides ramenés à un gramme de sédiment.

TABLEAU XIX

AMINO ACIDES EN µM APRES ELUTION PAR LES TAMPONS CITRATE A PH : 2,75 - 5 ET 10

Amino acides	Tampon 2,75	Tampon 5	Tampon 10	Total
Asp	41,25	0,95	0,13	42,33
Thr	40,25	0,82	0,08	41,15
Ser	43,46	1,04	0,14	44,64
Glu	40,49	0,86	0,08	41,43
Gly	52,02	1,44	0,26	53,72
Ala	44,07	0,99	0,18	45,24
Val	42,51	1,17	0,13	43,81
Cys	43,55	1,28	0,13	44,96
Met	46,16	1,46	0,18	47,80
Ile	43,22	1,36	0,04	44,62
Leu	42,01	1,37	0,04	43,42
Tyr	42,29	1,43	0,90	44,62
Phe	42,29	1,67	0,26	44,22
Lys	32,90	5,05	6,32	44,27
His	24,17	6,74	7,87	38,98
Arg	23,23	6,72	8,40	38,35
Total	644,07	34,35	25,14	703,56

Discussion :

Nous remarquons que dans le cadre d'une saturation d'un sédiment, par un mélange d'amino acides, chaque amino acide se fixe en quantité pratiquement équivalente, mais est élué différemment selon les pH. Cependant, les amino acides basiques lysine, histidine, et arginine sont fixés plus énergiquement puisqu'il est nécessaire d'utiliser un pH alcalin pour les éluer. Par ailleurs, la majeure partie des amino acides étant éluée à pH 2,75, nous pouvons penser que la fixation n'est pas uniquement du type électrovalenciel.

L'étude du tableau précédent (Tableau XIX) nous montre une différence de fixation de 15 µM entre les fixations totales du glycocolle et de l'arginine. Cette différence peut être due à une élution incomplète de l'arginine. Si nous examinons l'élution par les différents tampons :

- Pour le tampon 2,75, nous notons un déplacement en quantité importante de tous les amino acides. Par exemple, le pourcentage d'acide aspartique élué par le tampon 2,75 atteint 97,4 % de la quantité d'acide aspartique fixé sur le sédiment alors que pour les amino acides basiques, ce pourcentage diminue nettement, et se situe aux environs de 60 %.
- Pour le tampon 5, nous retrouvons dans l'éluat une faible quantité de tous les amino acides et pour reprendre les exemples précédents, nous récupérons de la quantité fixée d'acide aspartique 2,2 %, mais un pourcentage plus important pour les amino acides basiques soit : 16 % en moyenne.
- Pour le tampon 10, nous avons dans l'éluat une faible quantité d'amino acides : 0,4 % de la quantité fixée pour l'acide aspartique, exception faite pour les amino acides basiques pour lesquels nous obtenons en moyenne 24 % de la quantité fixée.

3) Recherche de la saturation d'une argile par un amino acide : le glycocolle (percolation) :

Que ce soit dans les sédiments récents du bassin d'ARCACHON ou dans le sédiment de rivière, le glycocolle est l'amino acide que nous retrouvons en quantité supérieure aux autres amino acides, c'est pourquoi, nous avons voulu déterminer son seuil de saturation. Pour saturer le sédiment, nous avons employé le même procédé que pour la solution d'amino acides (voir page 89). Nous avons tassé 3 grammes de sédiment traité et séché dans une seringue pour la confection de la colonne. Nous avons effectué la saturation à l'aide d'une solution de glycocolle à 1 000 µM/ml. Après chaque élution, l'éluat recueilli a été analysé par la méthode de SATAKE (voir page 44). Les résultats obtenus ont été transcrits sur le tableau suivant (tableau XX). Dans chaque cas nous avons calculé le pourcentage de fixation R.

Les résultats sont exprimés en µMoles de glycocolle fixé par gramme de sédiment.

TABLEAU XX

RESULTATS RELATIFS AUX ESSAIS DE SATURATION PAR LE GLYCOCOLLE

Ordre d'élution	Glycocolle en contact en µM	Eluat en µM	Glycocolle fixé en µM	R en %
1	1 000	575	425	42,5
2	1 000	700	300	30,0
3	1 000	750	250	25,0
4	1 000	1 000	0	0
TOTAL	4 000	3 025	975	

Nous avons obtenu, par la méthode de percolation, un maximum de fixation pour le glycocolle qui correspond à 975 µM par gramme de sédiment. Compte tenu de la quantité de glycocolle déjà présente dans ce sédiment (voir page 83) nous avons un total de 980 µM par gramme de sédiment. Nous constatons que, exprimée en µM, cette fixation est supérieure au chiffre obtenu (800 µM/g) pour la saturation du même sédiment par un mélange d'amino acides.

Le poids moléculaire du glycocolle est de 75,07. nous avons calculé la quantité de glycocolle fixé à saturation en gramme par gramme de sédiment :

$$980.10^{-6} \times 75,07 = 0,073 \text{ g/g}$$

soit 7,3 %

Ce résultat, bien que très important, est différent de celui obtenu dans le cadre de la saturation du sédiment par un mélange d'amino acides (voir page 91), et ne constitue en poids que la moitié de ce que nous avons trouvé pour le mélange.

4) Essais effectués par la méthode par contact à partir de différents amino acides.

a) Etude de la fixation d'un mélange d'amino acides en faible quantité :

Nous avons choisi le mélange d'amino acides déjà utilisé comme solution standard et contenant 45 µM/ml d'amino acides de nature différente (voir page 45).

Le protocole expérimental correspond à celui que nous avons décrit page 85 : 1 g de sédiment est placé en contact avec 5 ml de la solution d'amino acides à des concentrations variables pendant 2 heures. Le pH est voisin de 2. Après avoir été mélangée modérement, la suspension est centrifugée pendant 5 minutes à 3.000 tours/mn. Le dosage des amino acides non fixés est réalisé sur la fraction surnageante. Par différence avec la quantité initiale d'amino acides mis en contact, nous obtenons les amino acides fixés. Nous avons reproduit sur le tableau XXI, les résultats exprimés en micromoles d'amino acides fixés par gramme de sédiment. Dans la troisième colonne, nous avons fait figurer le rapport R correspondant au pourcentage de la quantité d'amino acides fixés par rapport à la quantité initiale d'amino acides mis en contact.

TABLEAU XXI

FIXATION DE QUANTITES CROISSANTES D'AMINO ACIDES

Amino acides en contact en µM (α)	Amino acides fixés en µM (α')	R en %	K'
9,0	7,2	80	0,25
13,5	9,5	70	0,42
18,0	13,6	75	0,32
22,5	15,7	68	0,43
27,0	19,4	71	0,39
31,5	23,5	74	0,34
36,0	27,4	76	0,31
40,5	28,1	69	0,44
45,0	33,2	73	0,35

Nous remarquons que le pourcentage d'amino acides fixés est sensiblement constant quelque soit la quantité mise en contact, aussi, nous pouvons proposer la réaction d'équilibre suivante :

$$[\text{Amino acide}] + [\text{Argile}] \rightarrow [\text{Complexe amino acide-Argile}]$$

et calculer la constante :

$$K = \frac{[\text{Amino acide}]\ [\text{Argile}]}{[\text{Complexe amino acide}]}$$

La quantité [Amino acide] représente le nombre de µM d'amino acides non fixés, soit $\alpha - \alpha'$ et [Complexe amino acide] équivaut au nombre de µM d'amino acides fixés, soit α'. Le terme [Argile] peut être considéré comme constant, ainsi la valeur de la constante peut être proportionnelle au rapport suivant :

$$K' = \frac{\alpha - \alpha'}{\alpha'}$$

Nous avons représenté sur le tableau XXI en dernière colonne la valeur de ce rapport, nous pouvons remarquer que ces chiffres sont proches les uns des autres, et s'écartent peu de la valeur moyenne 0,37. Les fluctuations dues aux erreurs de dosage étant relativement faibles, nous pouvons admettre que nous sommes en présence d'un équilibre hétérogène entre l'argile et les amino acides. Nous avons calculé l'écart type pour cette série d'expériences, il est de : $\sigma = 0{,}059$. L'intervalle de confiance à 95 % se situe donc à $\pm 2\ \sigma$ par rapport à la moyenne, soit : $0{,}361 \pm 0{,}118$.

b) Etude de la fixation d'un mélange d'amino acides en quantité plus importante :

Nous avons repris l'expérience précédente, afin de vérifier si pour des quantités supérieures à celles mentionnées dans le tableau XXI, nous obtenons des résultats similaires. Dans ce but, nous avons utilisé une solution contenant les amino acides précédents, à une concentration plus importante et identique pour chacun d'eux. Les quantités d'amino acides mis en contact avec un gramme de sédiment se situent entre 50 µM à 2 500 µM.

Le mode opératoire est le même que celui décrit page 85 : 5 ml de solution contenant des quantités croissantes d'amino acides ont été additionnées à un gramme de sédiment. Le pH est de l'ordre de 1,6. La suspension obtenue après agitation modérée, est centrifugée 5 mn à 3 000 T par minute. La fraction surnageante contenant des amino acides non fixés est analysée par la méthode au T.N.B.S. de PALMER et PETERS (Voir page 87). Par différence entre les quantités mises en contact et les quantités non fixées nous avons obtenu la quantité d'amino acides fixés. Dans le tableau XXII, nous avons reproduit les résultats exprimés en µM fixées par gramme de sédiment. Nous avons mentionné le pourcentage de fixation R, ainsi que la valeur de la constante d'équilibre K'.

TABLEAU XXII

FIXATION DE QUANTITES CROISSANTES D'AMINO ACIDES A PARTIR D'UNE SOLUTION PLUS CONCENTREE

Amino acides en contact en µM (α)	Amino acides fixés en µM (α')	R en %	K'
50	35	68	0,44
100	66	66	0,50
150	100	66	0,50
200	136	68	0,47
250	170	68	0,47
300	190	63	0,57
350	218	62	0,60
400	234	58	0,70
450	249	55	0,81
500	260	52	0,92
600	275	46	1,18
700	334	47	1,09
800	392	46	1,18
900	459	51	0,96
1 000	462	46	1,18
1 500	500	30	2,00
2 000	560	28	2,50
2 500	580	23	3,30

Nous remarquons dans le Tableau XXII que le pourcentage d'amino acides fixés reste stable jusqu'à la quantité d'amino acides mis en contact de 350 µM. Après cette valeur le pourcentage diminue, et cette diminution est particulièrement nette à partir de la quantité de 1 500 µM. La constante K' suit les mêmes variations, en effet, l'étude de cette constante calculée dans chaque cas, dépasse la valeur moyenne déterminée dans la première série d'expériences, sans pour autant s'en écarter de façon significative jusqu'à une quantité de 350 µM. L'écart type calculé pour les quantités d'amino acides allant de 50 à 350 µM est de 0,053. Nous constatons qu'il est proche de celui calculé précédement (voir page 97). Au delà de 350 µM, la constante s'élève, tout se passe comme si nous avions obtenu la saturation des sites dans le cadre de ce type d'équilibre hétérogène.

c) Etude de la fixation de différents amino acides :

Nous avons voulu étudier le rôle de la nature de l'amino acide sur la fixation. Pour cela nous avons préparé des solutions de chacun des amino acides en solution concentrée.

Le protocole opératoire est le suivant : à un gramme de sédiment nous ajoutons 5 ml de la solution d'amino acide à étudier, ce qui correspond à une quantité totale de 2 500 µM. Après agitation modérée pendant environ deux heures, la suspension est centrifugée. Le dosage des amino acides non fixés est réalisé sur le surnageant. Par différence entre la quantité d'amino acides mis en contact et la quantité récupérée, nous obtenons la quantité fixée par le sédiment. Ce sont ces résultats que nous donnons dans le tableau XXIII. Nous avons, en outre précisé le pourcentage de fixation R pour chaque amino acide, ainsi que le rapport établi précédement :

$$K' = \frac{\alpha - \alpha'}{\alpha'}$$

Les amino acides ont été classés dans l'ordre décroissant par rapport à la valeur de la constante : c'est ainsi que l'arginine qui est l'amino acide qui se fixe en plus faible quantité est en début de tableau, et que le glycocolle qui se fixe en plus forte proportion est en fin de liste.

Les résultats sont exprimés en µMoles fixées par gramme de sédiment.

TABLEAU XXIII

ETUDE DE LA FIXATION DE DIFFERENTS AMINO ACIDES

Amino acides	Amino acides en contact en µM (α)	Amino acides fixés en µM (α')	R en %	K'
Arg	2 500	50	2	49,00
His	2 500	100	4	24,00
Lys	2 500	100	4	24,00
Phe	2 500	150	6	15,00
Tyr	2 500	160	6	14,00
Ser	2 500	240	10	9,41
Glu	2 500	240	10	9,41
Asp	2 500	280	11	7,92
Val	2 500	300	12	7,33
Thr	2 500	300	12	7,33
Ile	2 500	330	13	6,57
Leu	2 500	360	14	5,94
Ala	2 500	370	14	5,75
Met	2 500	425	17	4,76
Cys	2 500	450	18	4,55
Gly	2 500	660	26	2,69

Nous constatons de grandes variations d'une part, entre les différents amino acides, et d'autre part, entre la fixation de chaque amino acide et la fixation du mélange d'amino acides (Voir tableau XXII). En effet, dans le mélange, il peut y avoir des interactions sur l'ionisation qui ne se retrouvent pas lorsque nous sommes en présence d'un seul amino acide, et en milieu nettement acide (pH 1,6). Néanmoins, le calcul de la constante K' va nous permettre de classer ces différents amino acides selon certaines affinités.

Ce classement est le suivant :

1 - Amino acides ayant peu d'affinité pour les argiles et une constante comprise entre 20 et 50. Ce sont : arginine, histidine et lysine.

2 - Amino acides à fixation moyenne dont la constante est comprise entre 9 et 20. Ce sont : phénylalanine, tyrosine, serine et acide glutamique.

3 - Amino acides à fixation plus élevée dont la constante est comprise entre 4 et 9. Ce sont : acide aspartique, valine, thréonine, isoleucine, leucine, alanine, methionine et cystine.

4 - Amino acides à fixation forte : glycocolle.

La dispersion relative des résultats ne nous permet pas de conclure à l'influence de la nature de l'amino acide sur sa fixation sur une argile. Néanmoins, nous signalerons que ce sont les amino acides basiques qui sont fixés en faible quantité, tandis que les autres amino acides le sont relativement plus. Dans cette série de résultats nous noterons le cas du glycocolle qui est l'amino acide possédant le poids moléculaire le plus bas, et qui est fixé en quantité nettement plus importante. Il pourrait y avoir au niveau de l'argile une possibilité de gel-filtration qui retiendrait les particules les plus légères.

d) Etude de l'influence du temps de contact sur la fixation des amino acides :

Dans les expériences suivantes, nous avons déterminé si un temps de contact plus ou moins prolongé entre une solution et un sédiment silico-argileux, avait une incidence sur la quantité d'amino acides fixés. Pour cela, nous avons placé 5 ml d'une solution contenant un mélange d'amino acides à 500 µM/ml en contact avec un gramme de sédiment (à pH 1,6) durant 10 minutes, 1 heure, 2 heures et 24 heures. L'émulsion, pendant ces différents laps de temps, a été agitée pour une série manuellement, et pour une autre série à l'aide d'un agitateur électrique°. Nous n'avons pas noté de différence entre les résultats des deux séries.

° *Type M22 RADIOMETER Ais Emdrupvej 72 DK 2400 COPENHAGUEN DANEMARK.*

Nous avons exprimé les résultats obtenus en µMoles par gramme de sédiment dans le tableau XXIV :

TABLEAU XXIV

FIXATION D'UN MELANGE D'AMINO ACIDES EN FONCTION DU TEMPS

Temps	Amino acides en contact en µM	Amino acides fixés en µM
10 mn	2 500	500
1 h	2 500	550
2 h	2 500	560
24 h	2 500	560

Nous constatons que la fixation, après 10 mn, est plus faible ; elle augmente jusqu'à 2 heures de contact, et semble ensuite stabilisée, la différence entre un contact de 10 mn et un contact de 2 heures est voisine de 10 %. Nous pouvons donc considérer que la fixation est maximum après deux heures d'agitation.

5) Essais effectués par la méthode par contact à partir du glycocolle.

a) Etude de la fixation du glycocolle en fonction du pH :

Lors de nos essais de fixation, nous nous sommes trouvés dans des conditions particulières de pH, nettement acide, qui ne se trouvent pas réalisées dans la nature. De plus, les élutions par les tampons à différents pH, nous ont montré une possibilité de variation de la fixation selon le pH, nous avons étudié ces variations.

Protocole opératoire :

Nous avons utilisé une solution de glycocolle à 1 000 µM/ml. Pour l'ajustement au pH voulu, il nous a été nécessaire de réserver la moitié du volume de cette solution, c'est pourquoi la concentration a été réduite de moitié, nous avons donc travaillé avec une solution à 500 µM/ml.

Le pH a été ajusté sur la suspension solution de glycocolle-sédiment. Deux possibilités ont été envisagées : la première a été d'obtenir le pH à partir de tampons citrate, mais les surnageants étant très colorés, nous avons abandonné cette technique. La deuxième a consisté à modifier dans le mélange, soit le titre de HCl, soit celui de NaOH, pour obtenir tous les pH.

Les suspensions aux différents pH (de 1 à12) ont été agitées modérement, puis centrifugées. Le surnageant a été analysé par la méthode de PALMER et PETERS (voir page 85). Pour chaque dosage à un pH déterminé, nous nous sommes référés à une gamme étalon faite à partir d'une solution de glycocolle au même pH.

Résultats :

Les résultats de la fixation du glycocolle en fonction du pH sont exprimés en µMoles fixées par gramme de sédiment. Ils sont résumés dans le tableau XXV, et nous avons mentionné le pourcentage de fixation R.

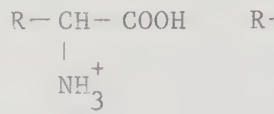
TABLEAU XXV

FIXATION DU GLYCOCOLLE EN FONCTION DU PH

pH	Glycocolle en contact en µM	Glycocolle fixé en µM	R en %
1	2 500	400	16
2	2 500	620	25
3	2 500	280	11
4	2 500	200	8
5	2 500	200	8
6	2 500	160	6
7	2 500	160	6
8	2 500	100	4
9	2 500	0	0
10	2 500	0	0
11	2 500	0	0
12	2 500	0	0

Nous remarquons que la quantité de glycocolle fixé passe par un maximum à pH 2 pour tendre vers 0 à pH 9.

Tous les amino acides se dissolvent dans l'eau pour donner naissance à des zwitterions, en milieu acide le groupement amine forme un ion ammonium, et en milieu basique c'est la fonction carboxylique qui est ionisée.



Milieu acide	Milieu neutre	Milieu alcalin

En milieu acide, c'est-à-dire pour des valeurs du pH inférieures au pH_i, la concentration en cations augmente. Or, nous constatons que la fixation du glycocolle est maximum à pH 2. Il semble bien que le sédiment silico argileux retienne en partie cet amino acide sous forme de cations suivant le mécanisme d'ions que nous proposons :

$$\text{sédiment } H^+ + AA^+ \rightleftarrows \text{sédiment } AA^+ + H^+$$

Il semble que les amino acides se fixeraient sur un sédiment, suivant en particulier, un phénomène d'échange d'ions ; mais l'impossibilité de calculer la constante K', nous confirme qu'un autre mécanisme intervient : la gel-filtration.

b) Influence de la nature de l'argile sur la fixation du glycocolle :

Nous avons voulu déterminer si la nature de l'argile avait une influence sur la fixation des amino acides. Pour cela nous avons essayé un certain nombre d'argiles de provenances différentes.

α - Dosage des amino acides dans les argiles :

Chaque argile a été soumise à l'hydrolyse chlorhydrique à ébulition pendant 24 heures sous réfrigérant à reflux à raison de 10 g pour 10 ml d'acide chlorhydrique 6 N. Après évaporation à sec le résidu a été repris par 10 ml d'eau bidistillée. L'hydrolysat obtenu a été filtré sur noir végétal jusqu'à obtention d'un liquide incolore. L'échantillon ainsi obtenu a été analysé par la méthode automatique au T.N.B.S. de PALMER et PETERS.

β - Différentes argiles utilisées :

Les différentes argiles que nous avons utilisées ont été dénommées d'après leur provenance. Dans le tableau suivant (tableau XXVI), nous les avons classées dans l'ordre décroissant de leur teneur en amino acides. A titre comparatif, nous avons indiqué les quantités d'amino acides présents dans les sédiments du bassin d'ARCACHON, et dans le sédiment de rivière. En regard de chaque argile, nous avons mentionné leur âge géologique, leur couleur et la présence de fer°. Lorsque nous avons plusieurs argiles en provenance du même lieu, mais de gisement différent, nous leur avons attribué un numéro d'ordre I, II ou III.

TABLEAU XXVI

DIFFERENTES ARGILES : PROVENANCE ET TENEUR EN AMINO ACIDES

Ordre	Provenance		Age°°	Couleur	Fer	Amino acides en γM
1	BASSUSSARY I	(1)	S	Ocre gris	+	1,02
2	ARJUZANX I	(2)		Verte	+	0,92
3	ARJUZANX II	(2)		Noire	+	0,70
4	LOUHOSSOA			Rouge	+	0,51
5	TARNOS I	(3)	T	Noire	+	0,46
6	BASSUSSARY II	(1)	T	Rouge	+	0,42
7	BRINDOS I	(1)	T	Gris	+	0,32
8	TARNOS II	(3)	T	Gris	+	0,25
9	BRINDOS II	(1)	T	Ocre	+	0,23
10	BRINDOS III	(1)	T	Ocre	+	0,15
11	ALLIER	(4)	S	Gris	+	0,15
12	PROVINS I	(4)	S	Gris	+	0,15
13	PROVINS II	(4)	S	Gris	+	0,10
14	PROVINS III	(4)	S	Gris	+	0,05
15	KAOLIN	(5)	P	Blanc	0	0
16	MONTMORILLONITE	(5)		Blanc	0	0
17	HALLOYSITE	(5)		Blanc	0	0
	Sédiment de rivière					25,00
	Sédiment d'ARCACHON					1,50 à 40,00

° *La présence de Fe^{+++} modifiant la technique chromatophique, nous ne l'avons pas appliquée pour ces argiles.*

°° *P = Primaire - S = Secondaire - T = Tertiaire.*

Nous remercions vivement toutes les personnes qui nous ont permis d'obtenir ces différentes argiles (voir tableau XXVI) :

(1) : Ces échantillons nous ont été fournis par la Tuilerie de la Négresse à BIARRITZ.

(2) : Ces argiles ont été prélevées dans la carrière attenante à la centrale thermique de MORCENX.

(3) : Ces argiles proviennent de la carrière de la tuilerie de TARNOS, la première a été prélevée en profondeur, la deuxième plus en surface.

(4) : Ces quatre échantillons nous ont été donnés par la FACOBA (Faïencerie de la Côte Basque) et sont en provenance de PROVINS et d'un gisement de l'ALLIER.

(5) : Ces trois argiles ont été fournies par la maison ALLUAUD, Kaolin et Pâtes céramiques du Limousin.

Nous avons mesuré le pH de ces différentes argiles. Pour cela, nous avons placé une partie aliquote de chacune d'elles dans de l'eau distillée pendant 24 H. La montmorillonite et l'halloysite présentent un pH inférieur à 7, toutes les autres sont proches de pH 7.

ψ - Capacité de fixation de ces argiles :

Pour déterminer la capacité de fixation de ces différentes argiles nous avons adopté la méthode par contact et centrifugation. Dans un premier temps, chaque argile a été broyée au mortier, puis séchée à l'étuve à 37° et, enfin tamisée sur gaze. Ensuite, nous avons pesé un gramme de chacune d'elles dans un tube à centrifuger, et nous l'avons placée en contact avec 5 ml d'une solution de glycocolle à 500 µM/ml : dans une première série à pH neutre, pour une deuxième série à pH 2. Après agitation modérée durant deux heures, l'ensemble a été centrifugé à 3 000 T/minute pendant 5 minutes. Le surnageant convenablement dilué a été analysé par la méthode au T.N.B.S. de PALMER et PETERS (voir page 87).

Sur le tableau suivant (tableau XXVII) nous avons mentionné les résultats des essais pour chaque argile; pour chacune d'elles nous donnons la quantité de glycocolle mis en contact et la quantité de glycocolle fixé, soit en milieu neutre, soit en milieu acide. Dans chaque cas, nous avons calculé le pourcentage de fixation R.

Les résultats des essais de fixation du glycocolle sur chaque argile sont exprimés en µMoles.

TABLEAU XXVII

RESULTATS DE LA FIXATION DU GLYCOCOLLE EN FONCTION DE LA NATURE DE L'ARGILE

Argile	Glycocolle en contact en µM	Milieu neutre		Milieu acide	
		Glycocolle fixé en µM	R en %	Glycocolle fixé en µM	R en %
1	2 500	0	0	100	4
2	2 500	50	2	170	7
3	2 500	20	0	40	1
4	2 500	25	1	170	7
5	2 500	0	0	100	4
6	2 500	0	0	50	2
7	2 500	150	6	250	10
8	2 500	175	7	280	11
9	2 500	0	0	150	6
10	2 500	0	0	50	2
11	2 500	0	0	100	4
12	2 500	0	0	50	2
13	2 500	0	0	250	10
14	2 500	0	0	50	2
15	2 500	0	0	150	6
16	2 500	375	15	750	30
17	2 500	350	14	750	30

Nous constatons que la fixation est nettement plus importante en milieu acide qu'en milieu neutre et ceci quelque soit la nature de l'argile. En milieu neutre, c'est-à-dire dans des conditions naturelles, seules certaines argiles (2, 3, 4, 7, 8, 16 et 17) fixent des amino acides. Parmi les argiles ne fixant pas d'amino acides en milieu neutre, nous remarquons que la plupart en contiennent à l'origine (voir tableau XXVI), il semble que la très faible quantité d'amino acides retrouvée lors de l'analyse de ces argiles n'est pas décelable dans les conditions expérimentales présentes.

Si nous comparons ces résultats avec ceux que nous avons obtenus sur le sédiment de rivière (voir page 100) nous ne retrouvons pas les quantités fixées, excepté pour la montmorillonite et l'halloysite. Ces deux sédiments sont d'autant plus intéressant qu'ils entrainent une diminution du pH, nous pouvons donc estimer que ce sont les argiles dites "acides" qui présentent les caractères nécessaires à une bonne fixation des amino acides.

III - CONCLUSION

Dans ce chapitre, nous avons essayé de préciser les conditions de fixation des amino acides sur un sédiment silico-argileux. Nous avons tenté d'élucider le mécanisme de cette fixation : l'hypothèse de fixation par échange d'ions n'est pas entièrement vérifiée car nous avons une grande quantité d'amino acides déplacés par une première élution (voir page 93) ; si nous reprenons l'hypothèse de la gel-filtration, elle semble plus vraisemblable avec quelques réserves puisque les amino acides de taille moléculaire très différente, tels que glycocolle et arginine, sont élués.

Nous avons montré que la méthode par percolation donne des fixations plus importantes que la méthode par contact, mais nous avons poursuivi nos expériences essentiellement avec cette dernière, car elle nous semble plus proche de ce qui se passe dans la réalité. Nous avons trouvé que la fixation des amino acides se fait préférentiellement en milieu acide et pour des amino acides à faible taille moléculaire. D'autre part, nous avons pu voir que cette fixation augmente lorsqu'il s'agit d'un mélange d'amino acides.

La nature de l'argile est prépondérante dans le mécanisme de fixation, mais les résultats ne dépendent pas de la teneur initiale de ces argiles en amino acides. Ce sont les argiles géologiquement bien définies, comme la montmorillonite et l'halloysite, qui présentent un maximum de possibilités dans la fixation des amino acides.

C H A P I T R E IV

APPLICATION A LA DEPOLLUTION DES EAUX

La pollution des eaux naturelles constitue un problème d'une très grande actualité mais pour lequel les moyens de lutte sont extrêmement réduits.

En effet, la pollution des eaux diminue dans de très fortes proportions le volume des eaux potables et la solution consistant à épurer les eaux usées par simple dilution dans les eaux naturelles, conduit en réalité à polluer un plus grand volume d'eau. L'avantage des eaux naturelles consistant en leur capacité d'auto-épuration, disparaît à partir du moment où la quantité de polluants est supérieure à la capacité d'épuration. A ce stade, les polluants ne sont plus épurés par la voie naturelle et les eaux deviennent impropres pour la faune et la flore, créant de ce fait des étendues liquides mortes pour lesquelles les dispositifs d'épuration ont disparu accentuant encore plus la pollution.

Dans ce chapitre, nous verrons à quel type de pollution nous pouvons appliquer les résultats déjà obtenus, nous résumerons les résultats du traitement proposé sur quelques eaux vannes de la région, puis nous présenterons un prototype d'un système de traitement à l'échelle du laboratoire.

I - INTRODUCTION

1°) Les origines de la pollution des eaux :

En principe une eau est polluée à partir du moment où elle est additionnée, volontairement ou non, de substances qui lui sont étrangères, qu'elles soient nocives ou qu'elles ne le soient pas. Une telle définition peut sembler excessive, mais elle reste quand même valable. Par exemple, le chlorure de sodium n'est pas nocif, mais son déversement en excès dans les rivières (en Alsace par exemple) conduit à une diminution de la potabilité des eaux.
Les origines de la pollution sont extrêmement diverses. Dans ce cadre nous pouvons citer les eaux d'égouts, elles correspondent : aux eaux pluviales, d'arrosage, de lavage public, aux eaux ménagères et vannes (humaines et animales). La pollution peut avoir également pour origine les eaux industrielles, principalement chimiques (papeteries) ou alimentaires (abattoirs).

Nous ne détaillons pas ici tous ces types de polluants, mais nous nous attacherons à un type de pollution, la pollution azotée. Cette pollution trouve son origine dans les eaux issues des abattoirs et dans les eaux d'égouts épurées ou non. En effet, les eaux d'égouts contiennent entre autre des protéines plus ou moins dégradées selon le degré d'épuration. La présence d'amino acides et de peptides constituent dans les rivières un apport nutritif de base important pour les micro-organismes aérobies qui les assimilent et de ce fait, se multiplient considérablement, consommant beaucoup d'oxygène en raison de leur nombre. C'est ainsi qu'un des critères de la pollution des eaux est la Demande Biochimique en Oxygène°.

° *La DBO (Demande Biochimique en Oxygène) est la quantité d'oxygène éventuellement consommée par les germes aerobies pour assurer la décomposition dans des conditions bien déterminées, des matières organiques contenues dans l'eau examinée. Plus la DBO est élevée, plus l'eau est polluée. La législation française admet une DBO de 30 mg par litre dans les eaux de rejet, or il est courant de voir des eaux industrielles ayant une DBO de 1 000 mg/l.*

Cette consommation excessive d'oxygène entraîne un appauvrissement de l'eau en oxygène et se traduit par la prolifération de micro-organismes et de planctons anaérobies producteurs d'hydrogène sulfuré, d'ammoniac et de méthane, créant un déséquilibre biologique considérable caractérisé par une augmentation de la mortalité de la faune et de la flore dont les résidus élèvent la DBO. Nous avons ainsi différents degrés d'eaux mortes, le stade ultime étant une eau où ne subsiste plus aucun métabolisme (Grands Lacs américains). Outre ce déséquilibre biologique plus particulièrement lié à la pollution azotée, une eau polluée est caractérisée de façon générale par un aspect désagréable visible par tous : eaux troubles souvent colorées, nappes de mousses stagnantes, odeurs nauséabondes.

Ces différents facteurs physiques ont pour conséquence la diminution de la fonction chlorophyllienne en empêchant la pénétration profonde des rayons solaires. De plus, une pollution d'eau est toujours accompagnée d'un effet thermique important qui se traduit par une accentuation des phénomènes précédents : la pression partielle de l'oxygène dans l'eau diminue et l'élévation de la température permet une multiplication des germes dans des conditions optimales. Cette pollution est repérable par photographie infra-rouge.

A ces phénomènes s'ajoute la présence de matières en suspension qui, favorisant l'envasement, s'opposent à la formation des herbiers indispensables aux poissons. Des fibres d'origine industrielle (de bois, de textile ou de verre) peuvent se fixer sur les branchies des poissons et provoquer leur asphyxie. A tout ceci s'associent enfin des variations de pH préjudiciables à l'équilibre biologique.

L'épuration artificielle des eaux aura pour but de transformer une eau polluée, en eau compatible avec la vie et ceci par différents moyens, par exemple : atténuation de la coloration et de la turbidité, élimination des matières en suspension et des matières organiques présentes, diminution de la DBO par oxygénation et neutralisation.

2°) *Procédés d'épuration :*

La pollution azotée retiendra particulièrement notre attention. Elle est liée au développement des villes où l'augmentation régulière des populations entraîne une forte utilisation d'eau. De ce fait, le volume des eaux vannes s'accroît considérablement et par conséquence augmente le volume des eaux rejetées par les stations d'épuration. En effet, les problèmes d'urbanisation posés par les grandes villes modernes conduisent à rassembler dans un même système d'évacuation les eaux de lavage, les matières fécales, urinaires et les déchets de cuisine.

Il y a quelques années, chacun de ces polluants était séparé et évacué dans certaines zones très peu habitées, la pollution était alors locale car le volume était relativement faible et la consistance plus solide. Avec l'apparition du "tout à l'égout", il devint nécessaire de fluidifier ces matières par addition d'une plus grande quantité d'eau (dix fois plus grande au moins), pour en permettre leur transport par écoulement dans des canalisations fermées. La création de stations d'épuration adaptées à la consistance "liquide" des eaux d'égouts s'est donc avérée nécessaire. Nous décrirons très rapidement les différents procédés utilisés.

a) L'autoépuration :

Il s'agit dans ce cas du déversement pur et simple par des stations de pompage des eaux vannes décantées ou non, dans des rivières, des lacs ou dans la mer, la "nature" se chargeant de l'épuration par dilution et oxydation. Cependant pour des volumes importants, ce procédé ne suffit plus, il faut, avant rejet, digérer les matières en suspension afin d'avoir un liquide homogène et si possible clair ; c'est le procédé suivant qui est le plus utilisé.

b) Les boues activées :

Les eaux vannes sont mélangées avec les boues activées dans des bacs spéciaux. Les bactéries présentes dans ces boues dégradent et liquéfient les matières en suspension. Les sédiments s'accumulent dans le fond des bassins et sont évacués après un certain temps car les germes actifs sont bloqués dans un milieu à très forte viscosité et ne sont plus efficaces. Les eaux ainsi traitées et décantées peuvent être réoxygénées pour parfaire leur épuration,

par passage sur des lits de charbons activés aérés, puis évacuées dans les rivières.

c) Le lagunage aéré :

C'est un procédé où pour accélérer le processus d'épuration par oxydation dans des lagunes de surface importante, il est pratiqué une aération et un brassage constant à l'aide de "rotors". Cette technique est employée soit pour les eaux d'égouts soit pour les eaux de rejet de papeteries (4).

d) L'épandage :

Les eaux d'égouts sont déversées sur des champs dont le sol assume, à la fois la filtration et l'épuration et dont la grande surface favorise l'oxygénation. Des puits placés à des distances variables de ces champs d'épandage permettent de vérifier l'évolution de l'effluent. Ce procédé est aussi employé pour les eaux de papeteries (33).

e) Le rejet en rivière :

Certaines stations d'épuration rejettent directement les eaux pluviales et traitent les eaux d'égouts proprement dites, contenant résidus alimentaires, déchets de toute sorte, suspensions de toute nature. Le rejet des eaux épurées et filtrées s'effectue dans les rivières tandis que les boues des bacs d'épuration sont envoyées dans des bassins de décantation et filtrées par des lits de sable.

f) Autres procédés :

D'autres procédés d'épuration préconisent des argiles. C'est le cas d'un procédé suédois (38) qui épure des eaux résiduaires par la montmorillonite, et d'un système américain employant un mélange de montmorillonite, kaolinite et illite (20). Le procédé STONE (50) fait appel à une couche d'alluvions sableuses. Ces procédés utilisent les argiles comme éléments filtrants, ils donnent de bons résultats à condition d'avoir de faibles volumes.
Nous remarquerons toutefois que dans certains cas, les eaux vannes sont rejetées directement sur des terres agricoles et utilisées comme engrais (28, 29, 32, 58). Le risque d'épidémie est considérable et incontrôlable.

3°) *Utilisation des sédiments :*

Les boues liquides provenant des stations d'épuration peuvent, dans certaines conditions, être utilisées comme adjuvant agricole en raison de leur teneur en phosphore et en dérivés azotés (1, 35, 43, 51, 52). Leur utilisation se fait à l'échelle industrielle soit sous forme de boues liquides (9, 18, 36, 44), soit sous forme de boues additionnées de tourbe (56). D'après WALTER (57) leur pouvoir fertilisant est efficace. Le risque de pollution microbienne semble être moins élevé que dans le cas précédent bien qu'il y ait apparition, surtout en été, d'une fermentation anaérobie dont l'odeur rappelle celle des vases du bassin d'ARCHACHON.

Ces inconvénients peuvent être réduits par l'opération de compostage (30) bien qu'elle entraîne la perte d'une partie des composés azotées (10) mais il devient nécessaire, pour commercialiser le produit sous forme de granulés (22), de le stériliser (5) et souvent de l'enrichir par une quantité variable de nitrate ou de phosphate (6, 26).

La valeur nutritive en agriculture des sédiments recueillis dans les égouts et les différents systèmes d'épuration, se trouve confirmée par ces quelques exemples (il existe des cas où ces sédiments servent d'adjuvants à la nourriture des porcs et des poulets (23)). Mais ces moyens de fertilisation posent quelques problèmes, en particulier : la propagation de bactéries pathogènes, la dissémination de poisons pour les plantes (détergents), la présence de graisses et d'odeurs désagréables ; HENSEL (21) a parlé d'altérations physiques du sol qui pourraient contrebalancer l'apport d'une certaine fertilité.

4°) *Discussion :*

La plupart des stations d'épuration conduisent à un rejet dont la composition reflète celle des eaux à épurer mais les matières en suspension qui sont visibles dans les eaux vannes sont solubilisées dans les eaux de rejet, donc invisibles. Cependant le problème reste entier dans la mesure où l'oxygénation n'a pas transformé ces substances en CO_2, H_2O et N_2. De plus le débit des eaux vannes est irrégulier, très abondant dans la journée, il entraîne une saturation des stations d'épuration et les eaux de rejet sont très polluées, alors que la nuit l'épuration est très valable. Enfin, pluies ou orages pertubent l'épuration et, là encore, le rejet peut être incomplètement épuré.

II - ESSAIS DE DEPOLLUTION D'EAUX VANNES PAR DES ARGILES

Les sédiments entrent pour une grande part dans les différents procédés d'épuration, mais ils n'ont en général qu'un rôle de support ou de filtre. Or, dans le chapitre précédent (chapitre III), nous avons vu qu'un sédiment possède la propriété de fixer les amino acides ; nous avons voulu mettre à profit cette propriété pour dépolluer des eaux vannes.

1°) - Protocole opératoire :

a) Origines des eaux vannes :

Nous avons utilisé des échantillons d'eaux vannes en provenance des stations d'épuration de BLANQUEFORT et de GRADIGNAN°. Ces eaux ont été prélevées avant passage dans le système d'épuration. Les eaux vannes de BLANQUEFORT sont légèrement opaques et de couleur marron clair ; elles dégagent une odeur d'hydrogène sulfuré. Après sédimentation elles présentent un précipité colloïdal de teinte marron, le surnageant est alors blanchâtre, le pH est de 7,9.
Les eaux vannes de GRADIGNAN sont nettement plus opaques que les précédentes et présentent une coloration jaune noirâtre. L'odeur d'hydrogène sulfuré qui s'en dégage est faible. Après sédimentation, il se forme un précipité de consistance assez solide et de couleur noire, le surnageant est alors jaunâtre, le pH est de 7,6.

Sur ces eaux nous avons évalué les amino acides totaux par la méthode au T.N.B.S. (voir page 87) Nous avons trouvé une teneur de 0,160 µM/ml pour les eaux de BLANQUEFORT et de 0,480 µM/ml pour les eaux de GRADIGNAN.
Nous avons concentré ces eaux dans le but de faire une analyse chromatographique, mais le produit concentré s'est révélé inutilisable pour les colonnes échangeuses d'ions en raison de son aspect sirupeux et coloré.

b) Nature des argiles utilisées :

Pour ces essais de dépollution, nous avons fait appel aux différentes argiles utilisées lors de nos essais de fixation des amino acides sur différentes sortes d'argiles.

° *Nous remercions Monsieur LAVILLE et Monsieur BARDY, ingénieurs de la ville, qui nous ont fourni les échantillons d'eaux vannes.*

Ces argiles ont été testées dans le même ordre que dans les expériences décrites page 105.

c) Mode opératoire :

Dans un tube à centrifuger, nous avons placé un gramme de chaque argile séchée et pulvérisée, et nous l'avons mélangé avec 5 ml d'eaux vannes. Après agitation modérée pendant environ 2 heures, chaque suspension a été centrifugée 5 minutes à 3 000 T/mn. Sur le surnageant, nous avons effectué les observations suivantes : couleur, turbidité et pH. Chaque type d'argile a fait l'objet de deux essais, l'un avec les eaux de BLANQUEFORT, l'autre avec les eaux de GRADIGNAN.

d) Résultats :

Nous avons choisi comme critères expérimentaux, la turbidité et la couleur des surnageants, après quelques heures d'agitation puis de centrifugation, afin de sélectionner les argiles conduisant à une eau claire et incolore. Nous avons ensuite procédé à une mesure du pH sur le surnageant. Les résultats obtenus ont été reproduits dans le tableau XXVII.

Les indications qualitatives correspondent à la progression suivante :

La référence pour la coloration est la solution d'iode à 0,005 N.

- Une décoloration est indiquée par 0.
- Aucun changement est désigné par +.
- Une augmentation est signalée par ++.

La référence pour la turbidité est une solution de protéines à 0,05 g/l traitée par l'acide trichloracétique : la turbidité de ces eaux permet de repérer des caractères imprimés sans pour autant les différencier.

- La clarification est indiquée par 0.
- Aucune modification est désignée par +.

TABLEAU XXVII

COULEUR, TURBIDITE ET pH DES EAUX VANNES DE BLANQUEFORT ET DE GRADIGNAN APRES TRAITEMENT PAR DIFFERENTES ARGILES.

ARGILE°	Eaux vannes de BLANQUEFORT			Eaux vannes de GRADIGNAN		
	Couleur	Turbidité	pH	Couleur	Turbidité	pH
1	+	0	7,9	+	0	7,6
2	+	+	7,9	+	+	7,6
3	+	+	7,9	+	+	7,6
4	+	+	7,9	+	+	7,6
5	+	0	7,9	+	0	7,6
6	++	+	7,9	++	+	7,6
7	+	+	7,9	+	+	7,6
8	+	+	7,9	+	+	7,6
9	++	0	7,9	++	0	7,6
10	++	+	7,9	++	+	7,6
11	+	+	7,9	+	+	7,6
12	+	+	7,9	+	+	7,6
13	+	+	7,9	+	+	7,6
14	+	+	7,9	+	+	7,6
15	+	+	7,9	+	+	7,6
16	0	0	7,0	0	0	6,9
17	0	0	6,8	0	0	6,7

Nous constatons pour les deux séries une accentuation de la coloration pour les argiles 6, 9 et 10, qui peut s'expliquer par le contact de ces eaux avec une argile fortement colorée en pH légèrement alcalin.
Nous remarquons la disparition de la turbidité pour les argiles 1, 5 et 9, mais la coloration persiste. Pour les argiles 16 et 17, turbidité et coloration ont disparu, de plus nous notons un abaissement du pH. Les argiles 16 et 17 qui sont la montmorillonite et l'halloysite (argiles acides°°)

° *Les numéros de référence de cette colonne correspondent à la terminologie décrite page 105.*

°° *Nous remercions Mr le Professeur SCHOELLER qui nous a conseillé ces deux types d'argiles acides.*

redonnent aux eaux un aspect clair et incolore et ramènent leur pH à la neutralité. Mais étant donné les difficultés pour nous procurer de la montmorillonite, nous avons retenu seulement l'halloysite pour le contrôle de la fixation des amino acides.

Les expériences de fixation des amino acides ont été effectuées sur deux séries d'échantillons pour chacune des eaux polluées. Dans la première série, le surnageant a servi au contrôle des amino acides totaux fixés, contrôle effectué par la méthode au T.N.B.S. déjà décrite page 87. Dans la deuxième série, le surnageant a été décanté et remis en contact avec un nouveau gramme d'halloysite : cette opération a été répétée une troisième fois avec une nouvelle quantité d'argile, et ainsi de suite jusqu'à ce que le surnageant ne contienne plus d'amino acides tout au moins décelables par cette méthode, c'est-à-dire à un taux inférieur à 0,030 µM/ml. Les quantités d'amino acides fixés sont obtenues en calculant la différence entre les quantités initiales et les quantités dosées dans le surnageant.

Dans le tableau XXVIII, nous donnons les résultats relatifs à la fixation des amino acides des eaux de BLANQUEFORT et de GRADIGNAN sur halloysite. Nous avons mentionné dans chaque cas, le nombre de passages.

TABLEAU XXVIII

ELIMINATION DES AMINO ACIDES PAR PASSAGES SUR L'HALLOYSITE

Passages sur l'halloysite	Amino acides eaux vannes de BLANQUEFORT en µM/ml	Amino acides eaux vannes de GRADIGNAN en µM/ml
0	0,160	0,480
1	0,080	0,240
2	0,040	0,120
3	<0,030	0,060
4		0,030
5		<0,030

Nous constatons une diminution de 50 % des amino acides présents dans les eaux vannes lors de chaque contact

avec un nouveau gramme d'halloysite, étant donné les faibles quantités de départ (respectivement 0,160 µM/ml pour les eaux de BLANQUEFORT et 0,480 µM/ml pour les eaux de GRADIGNAN) ce pourcentage est tout à fait normal.

La disparition des amino acides dosables par la méthode au T.N.B.S. s'effectue après trois passages sur halloysite pour les eaux de BLANQUEFORT et après cinq passages pour les eaux de GRADIGNAN ; cette différence s'expliquant par une teneur en amino acides plus importante des eaux vannes de GRADIGNAN. De plus nous constatons qu'après avoir servi trois fois l'halloysite se révèle impropre à fixer des amino acides, bien qu'étant loin d'être saturée (voir p. 107), et est incapable de clarifier et de décolorer les eaux vannes. Ce phénomène doit être en relation avec le fait que lors du contact entre l'halloysite et les eaux vannes, cette argile fixe différents éléments autres que les amino acides, ce qui bloque d'autant les sites de fixation.

L'halloysite est donc une argile efficace dans le cadre de l'épuration des eaux polluées ; elle répond à un certain nombre de critères dans ce domaine, puisqu'elle est capable de décolorer et de clarifier une eau polluée, elle provoque un abaissement du pH et elle fixe des matières organiques, notamment les amino acides.

III - MISE AU POINT D'UN APPAREIL SIMPLE D'EPURATION

Nous avons montré dans les expériences précédentes, que l'halloysite était une argile répondant le mieux aux critères que nous avions fixés (voir page 116). Cependant l'utilisation par agitation et décantation se révèle très rapidement inutilisable si l'on veut traiter des quantités importantes d'eau.

Nous avons voulu rechercher quelles étaient les conditions expérimentales indispensables à une bonne séparation en système continu. Nous avons choisi un procédé dans lequel l'argile et l'eau suivent un même trajet pendant un certain temps, réalisant le contact, puis amorcent une séparation à contre-courant reposant sur la centrifugation en continu. Les trois principes sont les suivants :

- Contact
- Centifugation
- Récupération eau
  boue

Sur la figure n° 23, nous avons reproduit un modèle en verre répondant à ces différents principes.

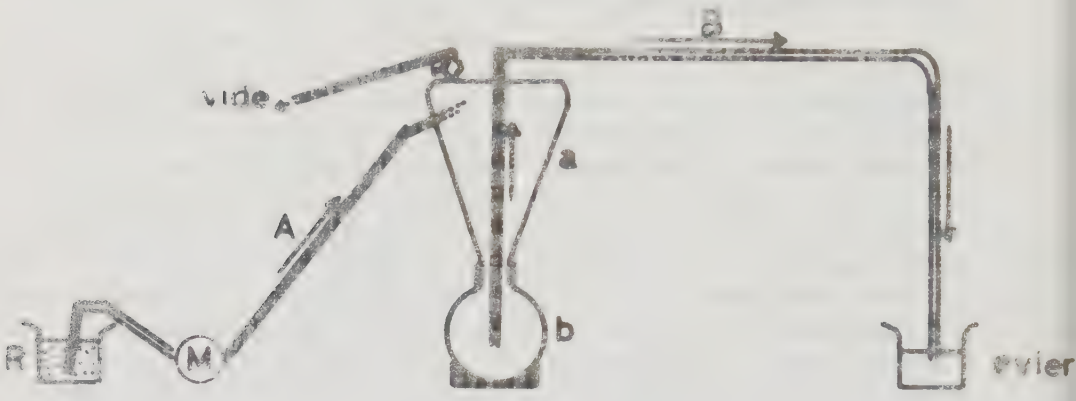


Figure n° 23 : Schéma de l'appareil d'épuration.

Le contact argile - eau polluée a été aisément réalisé dans un récipient R à l'aide d'un agitateur magnétique. De ce récipient, nous avons fait partir un tube A sur lequel nous avons intercalé une pompe mue par un petit moteur électrique. Le mélange est de ce fait aspiré à une certaine vitesse et pulsé dans le système. Ce système comprend un erlenmeyer renversé de un litre (a) dans lequel l'émulsion arrive de manière tangentielle sur les parois et prend un mouvement de rotation réalisant ainsi la centrifugation, ce mouvement rotatoire se continue dans un ballon de 500 ml (b) sous-jacent à l'erlenmeyer. Un deuxième tube B part du centre du ballon, traverse le fond de l'erlenmeyer, puis après un coude est orienté vers l'évier. Afin d'éviter l'accumulation des bulles d'air, inévitables au cours du pompage, nous avons installé un piège à la partie supérieure de l'erlenmeyer, piège muni d'un robinet et relié à une trompe à vide, ceci permettant l'évacuation indispensable au démarrage, puis en cours de fonctionnement l'élimination des bulles d'air qui se rassemblent en haut du système. La position de l'extrémité du tube par rapport au fond du ballon est déterminée par l'examen des différents courants liquidiens (clairs et opaques). Comme il nous a été difficile d'obtenir une évacuation d'eau claire avec ce premier système, nous lui avons apporter quelques modifications.

Sur la figure n° 24, nous avons décrit les modifications apportées au premier système.

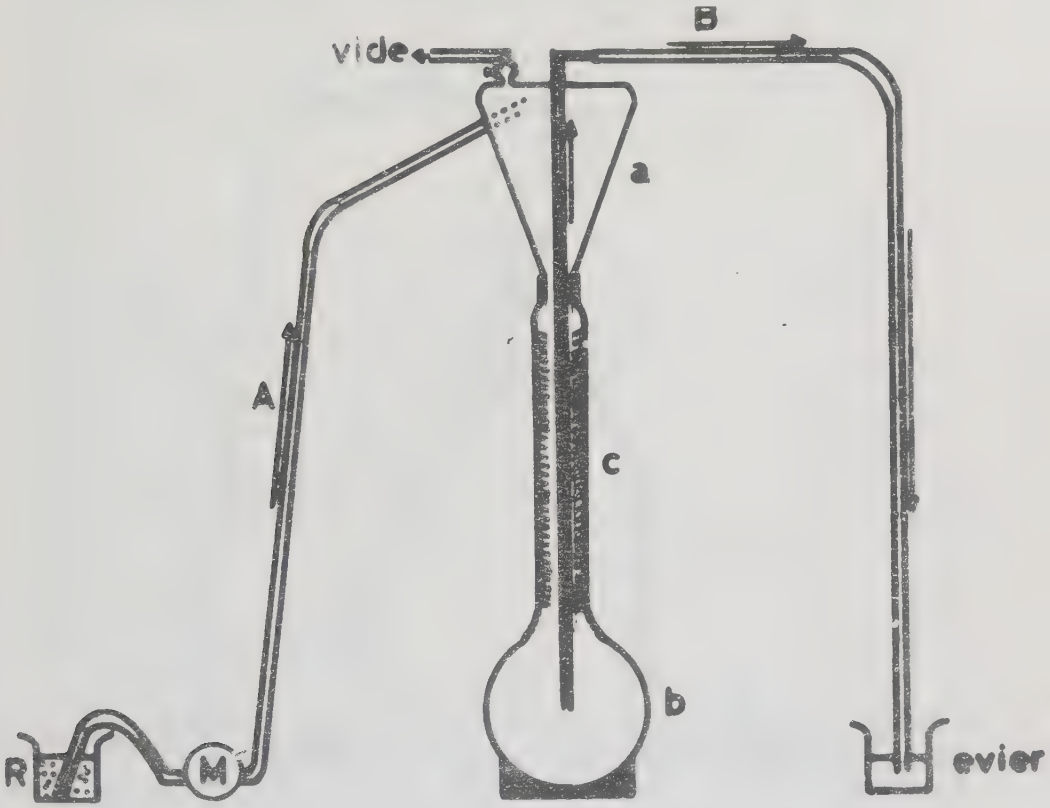


Figure n° 24 : Schéma de l'appareil d'épuration, première modification

Dans ce système nous avons intercalé entre le ballon (b) et l'erlenmeyer (a), une colonne antireflux (c) de soixante centimètres de hauteur pour améliorer la séparation des deux courants liquidiens, et nous avons porté la capacité du ballon (b) à deux litres.

Les résultats obtenus avec ce deuxième système ont été meilleurs que dans le cas précédent, bien que les digitations de la colonne antireflux ralentissent le mouvement de rotation dans le ballon. Nous avons été obligés d'incliner l'ensemble pour favoriser la sédimentation et séparer les deux courants, l'un chargé d'argile, l'autre correspondant au surnageant.

Dans un troisième système, les modifications ont porté sur la colonne antireflux et l'inclinaison du système (figure n° 25).

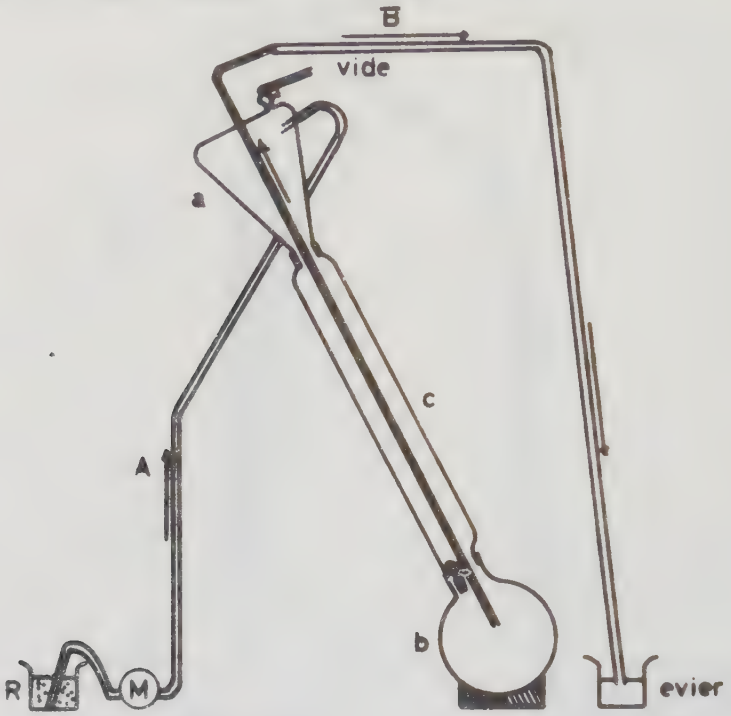


Figure n° 25 : Schéma de l'appareil d'épuration, deuxième modification

Les digitations ne nous permettant pas de récupérer un courant d'eau claire, la colonne antireflux a été remplacée par une colonne (C) lisse intérieurement de soixante centimètres de hauteur. Le système a été incliné d'environ 30° par rapport à la verticale. Pour éviter l'accumulation d'argile dans la colonne (c) nous avons relié sa partie inférieure au ballon par un tube de 1 cm de diamètre et le transfert de l'argile accumulée se fait par ce tube dans le ballon.

Les annexes du système restent identiques. Pour obtenir un courant d'eau claire et limpide, nous avons joué sur la vitesse de projection du liquide dans l'erlenmeyer. Le tube A a été biseauté à son entrée dans l'erlenmeyer pour accentuer et régulariser le processus de rotation dans le système.

Ce système constitue en fait un élément du procédé d'épuration. Le courant liquidien clair récupéré est mis de nouveau en contact avec de l'argile et pulsé dans un deuxième élément identique, puis dans un troisième, etc... Selon le degré de pollution d'une eau, nous pouvons déterminer le nombre d'éléments placés en série.

Résultats

Nous avons obtenu un courant d'eau ne présentant plus de trace d'argile et se situant dans le tiers supérieur du ballon, nous avons réglé la hauteur du tube B dans ce dernier pour capter l'eau épurée.
Mais malgré un très net avantage sur les systèmes précédents ce type de colonne ne nous a pas permis de contrôler effectivement dans des conditions précises la fixation des amino acides. Il aurait été nécessaire d'étudier plus à fond les différents critères : débit et concentration, afin d'obtenir une efficacité plus grande et une séparation argile eau plus facile ; ces études dépassant de loin les moyens mis à notre disposition.

IV - APPLICATIONS

Les deux expériences qui suivent, s'écartent du sujet que nous avons traité dans ce chapitre, mais nous avons voulu savoir, d'une part, si la méthode de dépollution proposée dans le cadre des eaux vannes pouvait être appliquée à d'autres eaux et, d'autre part, si les amino acides fixés sur l'halloysite pouvaient servir de substrat à la germination de graines.

Dépollution des eaux de papeteries.

Nous avons testé notre méthode sur les eaux de papeteries, car la pollution qu'elles entraînent dans notre région est préoccupante, nous avons voulu voir, si nous pouvions trouver une solution au problème des mousses.

Ces eaux ont été prélevées à la sortie de la papeterie, avant leur évacuation dans les bassins d'épandage. Elles sont très troubles et ont une coloration brune prononcée. Le traitement au sulfure de sodium, pour l'obtention de la pâte à papier, entraîne un grand nombre de lavages donnant des eaux dans lesquelles certains produits sont solubilisés et d'autres restent en suspension comme les fibres de cellulose. Le pH de ces eaux est à 8,4.

La recherche des amino acides sur ces eaux s'est révélée négative (méthode au T.N.B.S.).

Essais préliminaires

Nous avons voulu rechercher si une diminution du pH entrainait une modification de l'aspect de ces eaux. Pour obtenir un résultat valable, c'est-à-dire une eau claire et incolore, il a fallu ajouter de l'acide chlorhydrique fumant dans la proportion de 4 pour mille. Nous avons obtenu un résultat analogue avec de l'hydroxyde de silicium (2 g pour 5 volumes d'eau). L'action du chlorure de calcium s'est avérée efficace, mais ce procédé chimique ne se trouve pas dans les argiles. Ces différents essais nous ont montré que les eaux de papeterie peuvent être traitées avec un système induisant une diminution de pH et apportant des ions silicium. L'halloysite répond exactement à cette définition bien que dans ce cas précis nous nous écartons fondamentalement du problème des amino acides.

Résultats avec l'halloysite

Nous avons utilisé l'halloysite pour dépolluer les eaux de papeteries suivant le procédé décrit page 116. Après contact avec l'halloysite, les eaux de papeteries ont été décolorées et clarifiées, le pH est tombé à 6,89 et une agitation du surnageant a révélé la disparition du moussage. Le résultat étant satisfaisant, nous avons déterminé la quantité minimum d'halloysite nécessaire pour dépolluer ces eaux en appliquant la méthode à contre-courant. Nous avons obtenu une décoloration, une clarification et un abaissement du pH jusqu'à la troisième dilution, ce qui nous donne pour l'halloysite une efficacité dans la proportion de 1 pour 15 volumes d'eau.

Discussion

Dans les expériences précédentes, nous avons recherché la fixation d'amino acides sur une argile, notamment l'halloysite, dans l'expérience suivante, nous avons voulu voir si l'halloysite enrichie pouvait servir de substrat pour la germination de graines. Nous avons mis des graines de Raphanus Sativus, cruciféracés (radis), à germer sur de l'halloysite enrichie par les eaux vannes, et en parallèle, sur de l'halloysite humidifiée par de l'eau.

- Résultats

Les graines de radis ont germé sur les deux supports et n'ont progressé nettement que sur l'halloysite enrichie avec les eaux de GRADIGNAN : nous avons noté l'apparition de feuilles, de racines et de radicelles mais nous n'avons pu dépasser ce stade. Sur l'autre support, les plantules ont très vite dégénéré.

Cette germination est intéressante, mais le milieu pauvre en substances nutritives a entrainé une pertubation dans le développement des plantes. Par ailleurs, il semble que l'halloysite a fixé des substances impropres à la croissance des pousses, alors que des matières indispensables n'ont peut-être pas été fixées. Nous ne pouvons pas conclure à l'efficacité de l'halloysite, enrichie par des eaux vannes, comme substrat et il faut être très prudent pour l'utilisation industrielle de ce type de produit.

V - CONCLUSIONS

Dans ce chapitre, nous avons tout d'abord rappelé quelques notions sur la pollution et plus particulièrement sur la pollution azotée. Un rappel sommaire des différents procédés d'épuration dans lesquels les sédiments et les argiles jouent un rôle plus ou moins prépondérant, a été fait. Quelques cas d'utilisation de boues issues des différents systèmes d'épuration ont été énumérés.

Puis nous rapportons les résultats obtenus dans une série d'essais de dépollution, effectuée sur des eaux vannes en provenance de l'agglomération bordelaise, par différentes argiles, et nous montrons que l'halloysite est très efficace pour dépolluer ces eaux vannes.

A partir de ces données, nous décrivons un système simple d'épuration à l'échelle du laboratoire. Enfin, nous avons appliqué avec succès le pouvoir épurateur de l'halloysite aux eaux de rejet des papeteries et montré que les sédiments recueillis pouvaient être utilisés comme milieu de culture artificiel, avec cependant beaucoup de réserves.

° ° °

CONCLUSIONS GENERALES

Depuis sa création jusqu'à nos jours, l'homme a toujours été lié, directement ou non, aux sédiments argileux.
Si la nature de ces sédiments argileux a fait l'objet de travaux de la part de nombreux chercheurs, rares sont ceux qui ont pensé que des constituants organiques étaient associés à ces minéraux. Notre travail a eu pour but de contribuer à l'étude de la matière organique azotée fixée par les argiles et de préciser les mécanismes de fixation. Nous avons montré une application de ces propriétés à propos de la pollution azotée des eaux.

Dans la première partie, nous avons fait un rappel géologique sommaire sur les minéraux argileux, et mentionné quelques unes de leurs propriétés physico-chimiques. Puis, nous avons décrit le site naturel des sédiments étudiés : le bassin d'ARCACHON et plus précisément son aspect géologique et géographique.

Dans la deuxième partie, nous avons regroupé nos travaux personnels, où dans un premier chapitre, nous avons décrit les méthodes analytiques utilisées pour l'analyse des sédiments récents du "bassin d'ARCACHON" : techniques de prélèvements des échantillons, mesure du pH, dosage des ions sulfurés. Nous nous sommes plus particulièrement attachés à décrire les méthodes de dosage des amino acides et notamment, la méthode de SATAKE pour les amino acides totaux et la méthode chromatographique pour l'analyse différentielle des amino acides.

Dans un second chapitre, nous avons groupé les résultats obtenus sur les carottes de sédiment. Ils nous ont permis de préciser que sur la hauteur de la carotte se trouvent tous les amino acides classiques mais à des concentrations diverses allant de 34 mg/100 g à 680 mg/100 g. La concentration relative des amino acides diminue au fur et à mesure que le sédiment est plus profond, cette diminution est d'autant grande que la teneur en sable augmente.
La séparation des fractions d'amino acides avant et après hydrolyse montre qu'il est possible de mettre en évidence un polypeptide qui se trouve à tous les niveaux de la carotte. Tout se passe comme si une même biosynthèse d'un polypeptide avait lieu.

Dans un troisième chapitre, nous avons voulu préciser les conditions de fixation des amino acides sur un support argileux. Dans ce but, nous avons utilisé un sédiment de rivière, après élimination des amino acides libres. En faisant appel à des méthodes de filtration et de sédimentation, nous avons précisé l'influence de différents facteurs (concentration, pH, nature de l'amino acide) sur cette fixation, et montré que le mécanisme de fixation des amino acides dépendait à la fois des propriétés d'échange d'ions du sédiment et de ses propriétés de gel-filtration.

Enfin dans un dernier chapitre, nous avons appliqué ces propriétés à la dépollution d'eaux vannes de la région bordelaise. Pour cela, nous avons sélectionné les argiles les plus aptes à assumer ces fonctions et mis en évidence que deux d'entre elles étaient les plus actives, ce sont : la montmorillonite et l'halloysite. Nous avons enfin réalisé un prototype d'appareil permettant de réaliser à l'échelle réduite une dépollution valable des eaux vannes et de papeteries.

REFERENCES

1 - ANANDESWARA SASTRY C., SUBRAHMANYAM P.V.R., PILLAI S.C., - amino acids in treated sewage in India. Sewage ind. Wastes. 1948, 30, 1241-7, (Chem. Abstr., 1959, 53, 2513).

2 - ASSOCIATION NATIONALE DE LA RECHERCHE TECHNIQUE - Lutte contre la pollution des eaux. 1 vol., 182 p., édit. Eyrolles, Paris, 1969.

3 - ANSON M.L., EDSALL J.T., -Advances in protein Chemistry, 1 vol., 443 p., Académic Press Inc. Publishers., New-York.

4 - AUBIC J. - Recherches microbiologiques sur l'épuration par lagunage des eaux résiduaires des papeteries KRAFT., Thèse doct. 3ème Cycle Biol. Bordeaux 1971.

5 - BARTELS R., - Effect of different pretreatments of municipal sewage sludges on soil properties and productivity of sandy soils, Kali Brieje, 1969, 1, Ger. (Chem. Abstr., 1970, 72, 110351).

6 - BARTUNEK M., CECH S., DEYLOVA L., VESELY D. - Manufacture of fertilizers from nonpeptized sludges of biologically treated sewage, Chem. Abstr. 1969, 71, 2649.

7 - BOUCHET J.M. - Etude océanographique des chenaux du bassin d'ARCHACHON, Thèse Doct. Sc. Nat. Bordeaux 1968.

8 - BRINDLEY G.N., ROBINSON K. - The structure of kaolinite. Miner. Mag., 1946, 27, 242-53.

9 - BUCHNER K. - Sewage treatment and irrigation with sludge. Gesundh. Ing., 1930, 53, 361. (Chem. Absrr., 1932, 26, 1367).

10 - CHAPLIN C.A., REGAN C.J. - Investigation of plant-growth substances (auxins) in sewage products. J. Soc. Chem. Ind. 1945, 64, 331-2. (Chem. Abstr., 1946, 40, 2562).

11 - CONNAN J. - Contribution à la connaissance de la matière organique de quelques sédiments marins et lacustres Thèse Doct. Sc. Phy. Strasbourg, 1970.

12 - DAYHOFF M., ECK R., PARK C. - Atlas of Protein Sequence and Structure, 1972, 5.

13 - FABRE A. - Les terrains de revêtement du Médoc. Thèse Doct. Sc; Nat. Paris, 1939.

14 - GRUNER J.W. - The Crystal Structure of Kaolinite., Z. Kristallogr., 1932, 75-88.

15 - HAMILTON P.B. - Ion exchange chromatography of amino acids. Effect of resin particle size on column performance. Anal. Chem., 1958, 30, 914-19.

16 - HAMILTON P.B. - Ion exchange chromatography of amino acids. Study of effects of righ pressures and fast flow rates. Anal. Chem., 1960, 32, 1779-81.

17 - HAMILTON P.B. - Ion exchange chromatography of amino acids. A single column, righ resolving, fully automatic procedure. Anal. Chem. 1963, 35, 2055-64.

18 - HARPER H.J. - Sewage sludge as fertilizer. Sewage Wks J., 1931, 3, 683-7. (Chem. Abstr. 1933, 27, 1432).

19 - HAXAIRE A. - Sorption des molécules organiques azotées sur la montmorillonite. Thèse Doct. Pharm. Nancy, 1956.

20 - HEMPHILL L., SWANSON W.S. - Sorption of organic acid on clay mineral in aqueoris solution. Am. Chem. Soc., 1963, 9-13. (Chem. Abstr. 1964, 61, 11738).

21 - HENSEL W. - Alteration in physical properties of soil from sewage irrigation. Bodenk. Pflernähr., 1939, 13, 257-304. (Chem. abstr. 1940, 34, 207).

22 - HUDSON J.W., FERJUSON B.D. - Granulation of sewage sludge. Chem. Abstr. 1969, 71, 15885.

23 - HURWITZ E. - The use of activated sludge as an adjuvant to animal feeds. Purdue Univ. Eng. Bull. Ext. Ser. 1957, 94, 395-414. (Chem. Abstr. 1959, 53, 605).

24 - JENSEN R. - Microdosage ampérométrique du sélénium. Chim. Analyt. 1952, 10, 394-396.

25 - JENSEN R. - Influence de la concentration en chlorure de sodium du gradient de tampons sur l'élution des amino acides. Technicon Symp., New-York, 1965.

26 - JOSHI R.H., DESHPANDE T.L. - Use of silt from tank and other sources as a manure in Madhya Pradesh., J. Indian Soc. 1953, 1, 125-30. (Chem. Abstr., 1954, 48, 7830 i.).

27 - KATCHALSKY A. - Prebiotic Synthèse of polypeptides by heterogeneous polycondensation of amino acids adenylates. Nature. 1970, 228, 636-9.

28 - KOSTKA - Irrigation with sewage. Kulturtechniker, 1941, 213-22. (Chem. Abstr. 1945, 39, 2170).

29 - KRAMER D. - Nutrient value of sewage in land treatment. WassWirst. WassTech., 1969, 19, 125-30, (Chem. Abstr., 1969, 71, 80292).

30 - LAROUSSE encyclopédique (Gd), 1, 562.

31 - LITTRE - Dictionnaire de la langue française. , 1, 1877.

32 - LYSOGOROV S.D., USHOKARENKO V.A. - Effect of waste waters on the fertility of irrigated soil. Tr. Klar'kov. Sel'shokhoz. Inst. 1969, 81, 70-6 (Russ). (Chem. Abstr., 1971, 74, 12451).

33 - MARCHAND M. - L'épuration biologique des eaux résiduaires des papeteries par infiltration dans le sol : modalités de biodégradation des alcali-lignines. 2 vol. Thèse Doct. Sc. Nat. Bordeaux, 1971.

34 - MAUGUIN Ch. - Etude des micas au moyen des rayons X. Bull. Soc. fr. Minér. Cristallogr., 1928, 51, 285-332.

35 - MEERA BAI B., VISWANATHAN C.V , PILLAI S.C - amino acids in sewage during treatment. J. scient. ind. Res. 1962, 21, 72-6. (Chem. Abstr. 1962, 57, 3219).

36 - MERZ R.C. - Utilization of liquid sludge in reclamation of waste land. Wat. Sewage Wks, 1959, 106, 489-93. (Chem. Abstr., 1960, 54, 11344).

37 - MILLOT G. - Géologie des argiles, 1 vol., 500 p., Edit. Masson and Cie, Paris, 1963.

38 - MITCHELL Engenering Ltd, Carrol C. Bullough - Fertilizer. Chem. Abstr., 1945, 40, 2918.

39 - NORTHROP M. - Center for Environement of Man : Determining effectiveness of global atmospheric and oceanic environemental monitoring systems. Colloque internationnal sur l'exploration des eaux. Thème V. Bordeaux, 1971.

40 - OPARIN I.A. - Origin and evolution of metabolisme. In evolutionary biochemistry. 5ème congrès internationnal de Biochimie. Moscou, 1961, 3, 69-85.

41 - PALMER D.W., PETERS J. - Simple automatic determination of amino acids in serum plasma using T.N.B.S., Technicon Symp., New-York, 1965, 324-7.

42 - PAULING L. - The structure of the micas and related minerals. Proc. natn. Acad. Sci. 1930, 16 123-9.

43 - PILLAI S.C., MOHAN RAO G.J., KRISHWAMURTHY K., PRADHAKARA RAO A.V.S. - Amino acids in sewage and activated sludge. Curr. Sci. 1953, 22, 235. (Chem. abstr. 1954, 48, 3602).

44 - ROBERTON L.F. - Disposal or sludge in liquid form for use as a fertilizer. Wat. Sewage, 1948, 86, 56, 70-2. (Chem. Abstr., 1949, 43, 3547).

45 - ROSNAY J. - Protéïnes primitives catalysées par les argiles. La Recherche 1971, 2, 180-1.

46 - SASTRY C.A. - Removal of amino acids from sewage by activated sludge. Environ. Health, 1965, 7, 111. (Chem. Abstr., 1967, 66, 49065).

47 - SATAKE K., OKUYAMA T., OHASHI M., SHINODA T. - The spectrometric determination of amino acids and peptide with 2, 4, 6. Trinitrobenzène 1. Sulfonic acid. J. Bioch. 1960, 47, 654.

48 - SIESKIND O. - Contributions à l'étude des interactions, argile, matière organique : absorption des acides aminés par la montmorillonite. Thèse Doct. Sc. Phy. Stasbourg, 1963.

49 - STOCK J.T. - Amperometric titrations, 1 vol., 140-57. Interscience Pub., New-York, 1965.

50 - STONE A.R. - Land in sewage purification. J. Proc. Inst. Sew. Purif., 1960, 417-24. (Chem. Abstr., 1961, 55, 22674).

51 - STOUGHTON R.H. - Use of habitation wastes in agriculture and horticulture. Surveyor, 1946, 105, 461-2. (Chem. Abstr., 1946, 40, 5521).

52 - SUBRAHMANYAM P.V.R., ANANDESWARA SASTRY C., PRABHAKARA RAO A.V.S., PILLAI S.C. - Amino acids in sewage sludges. J.Wat. Pollut. Control Fed., 1960, 32, 344-50. (Chem. Abstr., 1960, 54, 1577).

53 - SUED-CHEMIE A.G. - Bleaching earth waste for purification of sewage. Chem. Abstr., 1971, 74, 67468.

54 - TALIBUDEEN O. - Complex formation betwenn clays and amino acids and proteins. Trans. Faraday Soc., 1955, 51, 582-590.

55 - TAYLOR J.R. - Le jugement dernier, 1 vol., 285 p. Edit. Calmann-Levy, Paris, 1971.

56 - TRENEL M. - Soil improvement with Peat, decomposed refuse, and sewage sludge. Albrecht. Thaer. Arch. 1961, 5, 199-215. (Chem. Abstr., 1962, 57, 7645).

57 - WALTER B. - Salt accumulation in clay slate by sewage sludge. Landw. Forsch. 1969, 23 (11), 121-7. (Chem. Abstr. 1970, 72, 89300).

58 - WIERZBICKI, J. - Sewage utilisation in agriculture Gaz. Woda Tech. Sanit. 1969, 43 (5), 167-70 (Pol.). (Chem. Abstr., 1969, 71, 94539).

59 - WOOD J. - Determination of free amino acids in sea water. Technicon Symp. New-York, 1965, 652-5.

TABLE DES MATIERES

Pages

AVANT-PROPOS..... 1
INTRODUCTION..... 5

PREMIERE PARTIE - Différents sédiments qui ont fait l'objet de notre étude... 9

Chapitre I : Etude physico-chimique des sédiments silico-argileux..... 11

I - Structure..... 12
II - Stabilité des argiles en fonction du milieu..... 15
III - Association argile-matière organique..... 16

Chapitre II : Le site naturel des sédiments étudiés..... 17

I - Aspect géologique du bassin d'ARCACHON..... 18
II - Aspect géographique du bassin d'ARCACHON..... 22

DEUXIEME PARTIE - Travaux personnels..... 25

CHAPITRE I : Analyse des amino acides des sédiments du bassin d'ARCACHON Méthodes analytiques..... 29

I - Introduction..... 30
II - Différentes mesures effectuées..... 34
III - Conclusion..... 60

Chapitre II : Résultats de l'analyse des sédiments du bassin d'ARCACHON.. 61

I - Composition du sédiment en amino acides..... 62
II - Composition de l'eau de mer en amino acides..... 66
III - Composition du sédiment en amino acides totaux..... 67
IV - Discussion..... 69
V - Conclusion..... 78

Chapitre III : Capacité de fixation des amino acides par une argile.. 79

I - Introduction..... 80
II - Fixation des amino acides..... 84
III - Conclusion..... 108

Chapitre IV : Application à la dépollution des eaux..... 109

I - Introduction..... 110
II - Essais de dépollution d'eaux vannes par des argiles..... 115
III - Mise au point d'un appareil simple d'épuration..... 119
IV - Applications..... 123
V - Conclusion..... 125

CONCLUSIONS GENERALES..... 127
REFERENCES..... 129